

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Evaluación de la actividad citotóxica y antimicrobiana
de glicoalcaloides esteroidales de las hojas de *Solanum
albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal**

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Jhonny Smit Olortegui Quiroz

Mary Carmen Brañez Espinoza

ASESOR

César Máximo Fuertes Ruitón

Lima-Perú

2009

*A Dios fuente de luz y sabiduría
que guía mi camino,
acompañándome a lo largo de la
vida brindándome fuerzas para
vencer obstáculos y hacer
posible el logro de mis metas.*

*A mi padre José,
quien en todo momento de
mi vida me apoya y orienta para
seguir por el sendero de la vida.*

*A mi madre Esmilda,
que con su cariño y apoyo
incondicional es la fuerza
que me impulsa a seguir adelante.*

*A mis hermanas Jicela y Denit; así
como a Marynes Yeren Olivares
por su apoyo, comprensión y cariño,
me ayudaron a ser un profesional.*

Jhonny

*"No basta saber, se debe también
aplicar.*

*No es suficiente querer, se debe
también hacer"*

Johann Wolfgang Goethe.

*Agradezco a mi padre Victor
por su ayuda y apoyo incondicional
en el transcurso de mi vida.
A él van todos mis triunfos y glorias.*

*A mi madre Ana por sus
consejos y por creer siempre en mí.
Para ella todo mi amor.*

*A mi hermana Vicky
y mi abuelita Gudelia
por siempre estar a mi lado
en los buenos y malos momentos.*

*A mi gran amor Elvis,
por siempre estar conmigo y
tenderme su mano en los
momento difíciles.*

Mary

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica Alma Mater y Crisol de nuestra profesión por acogernos en sus aulas, formándonos y orientarnos para llegar a ser profesionales.

Deseamos expresar un agradecimiento especial al Mg. César Fuertes Ruitón por darnos la oportunidad de trabajar con él y de poder realizar este trabajo en los laboratorios del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Juan de Dios Guevara; asimismo, por brindarnos sus enseñanzas y orientación invalorable, mil gracias Doc.

A los Laboratorios IQFarma SA, por el apoyo brindado en la realización de la tesis, en especial a la Dra. Juana Huayhua Escurra y al Dr. Gerver Rivas Blas, que me brindaron su apoyo, ayuda y consejos, los cuales aprecio mucho, con el cual permitieron la realización de este trabajo.

A los laboratorios TRIFARMA S.A. por el apoyo brindado.

A los distinguidos miembros del jurado examinador y calificador, nombrado por la Facultad de Farmacia y Bioquímica conformado por:

Presidente: Mg. Norma Carlos Casas

Miembros: Q.F. Jesús Lizano Gutierrez

Mg. Mirtha Roque Alcarraz

Q.F. Maria Elena Salazar Salvatierra

Jhonny y Mary

ÍNDICE

Resumen

Summary

I.- Introducción

.....
1

II.- Generalidades

1- Familia Solanaceae

..... 2

2.- Glicoalcaloides

..... 4

3.- Toxicidad de los Glicoalcaloides

..... 8

4.- Método para la Cuantificación de Glicoalcaloides

..... 10

5.- Actividad Citotóxica Evaluada En Erizo De Mar

10

6.- Actividad Antimicrobiana

..... 11

Parte experimental

III.- Materiales y Métodos

1.- Colección de la Especie Vegeta

..... 13

2.- Equipos, Reactivos y Materiales

..... 13

3.- Extracción de los Glicoalcaloides

..... 15

4.- Eliminación de la Clorofila	16
5.- Identificación de los Glicoalcaloides	16
6.- Cuantificación de los Glicoalcaloides	16
7.-Bioensayo de Citotoxicidad	17
8.- Ensayo Antimicrobiano	19
IV.- Resultados	
1.- Estudio Taxonómico	21
2.- Estudio Fitoquímico	22
3.- Cuantificación de Glicoalcaloides	23
4.- Bioensayo de Citotoxicidad	26
5.- Ensayo Antimicrobiano	42
V.- Discusión	63
VI.- Conclusiones	65

VII.- Recomendaciones	
.....	66
VIII.- Bibliografía	
.....	67
IX.- Anexos	

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo aislar, identificar glicoalcaloides esteroidales de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal y evaluar su actividad citotóxica y antimicrobiana; las especies mencionadas fueron colectadas en el departamento de Cajamarca, provincia de San Ignacio. Los glicoalcaloides fueron identificados por el método cromatográfico y espectrofotometría infrarroja; y la cuantificación por titulación potenciométrica automática por punto de inflexión. Para evaluar la actividad citotóxica se empleó el método de desarrollo embrionario en huevos fértiles de erizo de mar (*Tetrapigus níger*) donde los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal presentaron actividad citotóxica, La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el método de recuento en placa con las siguientes cepas *Escherichia coli* ATCC® 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, *Salmonella enterica* ATCC® 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404, *Candida albicans* ATCC® 10231, donde se demostró dicha actividad.

Palabras clave: glicoalcaloides, citotoxicidad, actividad antimicrobiana, *Solanum albidum* Dunal, *Solanum oblongifolium* Dunal, espectro IR, azul de bromofenol.

SUMMARY

The purpose of the present study was to isolate, identify, and assess the content of steroidal glycoalkaloids (SGAs) from leaves of *Solanum albidum* Dunal and *Solanum oblongifolium* Dunal belonging to province San Ignacio, Cajamarca. Also, it was determined their cytotoxicity and antimicrobial activity. The steroidal glycoalkaloids were identified by means of chromatography and infrared spectrophotometric analyses. The content of steroidal glycoalkaloids was quantified by automatic potentiometric titulation using the inflection point. The cytotoxic activity of SGAs was observed in sea urchin embryos *Tetrapygus niger*. The antimicrobial and antifungal activities were evaluated by using the plate counting method, including the following type strains respectively: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), and *Candida albicans* (ATCC 10231), which showed that activity

Keywords: steroidal glycoalkaloids, cytotoxicity, antimicrobial activity, *Solanum albidum* Dunal, *Solanum oblongifolium* Dunal, IR spectrum, bromophenol blue.

I.- INTRODUCCIÓN

Desde épocas muy remotas el hombre siempre ha buscado y encontrado remedios para sus enfermedades en la naturaleza, especialmente en el reino vegetal, constituyendo hoy en día el uso de plantas medicinales una gran alternativa para preservar y recuperar la salud sobre todo en comunidades que están geográfica o culturalmente aisladas. Motivos suficientes para profundizar en el conocimiento de nuestras especies vegetales medicinales.

Muchos medicamentos desarrollados han sido controversiales, cada uno de ellos tiene uso limitado, son terapias muy costosas y una vez establecido muchas veces su efectividad se reduce y el tratamiento debe acompañarse a la vez con otros medicamentos.

Estas circunstancias han motivado la búsqueda de compuestos naturales o sintéticos que tengan actividad biológica, con una baja toxicidad y desde el punto de vista económico, asequibles.

Diversas plantas de la familia de las solanáceas, especialmente las del género *Solanum*, son conocidas como fuentes de sustancias estructuralmente relacionadas con las saponinas esteroidales, llamados glicoalcaloides ^(17, 18).

Los glicoalcaloides se clasifican como metabolitos de estrés y se consideran que son importantes en el control de algunas enfermedades por hongos, nemátodos e insectos ⁽²⁾.

En tal sentido, en el presente estudio se decidió aislar los glicoalcaloides de las hojas de dos especies vegetales de la familia Solanaceae: *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal y estudiar sus propiedades citotóxicas, frente al desarrollo embrionario de erizos de mar, así como su actividad antimicrobiana frente al crecimiento de cuatro tipos de bacterias un hongo y una levadura, trabajando con un control y un blanco, además de utilizar equipos e instrumentos calibrados. La presente tesis se realizó en los Laboratorios del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Juan De Dios Guevara, Laboratorios TRIFARMA S.A. y Laboratorios IQFarma S.A..

La hipótesis planteada fue: Los glicoalcaloides esteroidales de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal, tienen actividad citotóxicas y antimicrobiana; teniendo como objetivo general estudiar las propiedades citotóxicas y antimicrobianas de los glicoalcaloides aislados de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal, y como objetivos específicos aislar y cuantificar los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal y determinar la propiedad citotóxica y antimicrobiana de los glicoalcaloides .

II.-GENERALIDADES

1.- LA FAMILIA SOLANACEAE

Las solanáceas son plantas herbáceas, sub-arbustos, arbustos, árboles o lianas. Pueden ser anuales, bienales o perennes, erguidas o decumbentes. Pueden estar provistas de tubérculos subterráneos. No presentan laticíferos, ni látex, ni jugos coloreados. Pueden presentar una agregación basal o terminal de hojas o pueden no tener ninguno de ambos tipos. Las hojas son generalmente alternas o alternadas a opuestas (o sea, alternas en la base de la planta y opuestas hacia la inflorescencia). La consistencia de las hojas puede ser herbácea, coriácea, o pueden estar transformadas en espinas. En general las hojas son pecioladas o subsésiles, raramente sésiles. Frecuentemente son inodoras pero, en ocasiones, son aromáticas o fétidas. La lámina foliar puede ser simple o compuesta, en este último caso, pueden ser ternadas o pinnatífidas. La nerviación de las hojas es reticulada y no presentan un meristema basal. Con respecto a la anatomía foliar, las láminas son en general dorsiventrales, sin cavidades secretoras. Los estomas se hallan en general confinados a una de las caras de las hojas, raramente se los halla en ambas caras.

Las flores son en general hermafroditas, si bien hay especies monoicas, andromonoicas o dioicas (como por ejemplo, algunos *Solanum* o *Symonanthus*). La polinización es entomófila. Las flores pueden ser solitarias o estar agregadas en inflorescencias cimosas, terminales o axilares. Las flores son de tamaño intermedio, fragantes (como en *Nicotiana*), fétidas (*Anthocercis*) o inodoras. Las flores son actinomorfas, levemente cigomorfas o marcadamente cigomorfas (como por ejemplo, las flores con corola bilabiada en *Schizanthus*). Las irregularidades en la simetría pueden deberse al androceo, al perianto o a ambos a la vez. Las flores en la gran mayoría de los casos presentan un perianto diferenciado en cáliz y corola (con 5 sépalos y 5 pétalos, respectivamente), un androceo con 5 estambres y dos carpelos unidos formando un gineceo con ovario súpero (se dice, entonces, que son pentámeras y tetracíclicas). Usualmente presentan un disco hipógino. El cáliz es gamosépalo (ya que los sépalos están unidos entre sí formando un tubo), con los 5 (a veces 4 o 6) segmentos iguales entre sí, es pentalobulado, con los lóbulos más cortos que el tubo, es persistente y puede muy a menudo ser acrescente. La corola usualmente presenta 5 pétalos que también se hallan unidos entre sí formando un tubo. La corola puede ser campanulada, rotada, infundibuliforme o tubular.

El androceo presenta 5 estambres (raramente 2, 4 o 6), libres entre sí, opositisépalos (es decir, alternan con los pétalos), son usualmente fértiles o, en algunos casos (ejemplo, en *Salpiglossideae*) con estaminoideos. En este último caso, pueden presentar un solo estaminoideo (*Salpiglossis*) o 3 (*Schizanthus*). Las anteras pueden ser conniventes, tocándose en su extremo superior formando un anillo, o totalmente libres, dorsifijas o basifijas, bitecas, con dehiscencia poricida o a través de pequeñas fisuras longitudinales. El filamento

de los estambres puede ser filiforme o aplanado. Los estambres pueden estar insertos dentro del tubo corolino o exsertos. La microsporogénesis es simultánea, la tétrada de microsporas es tetrahédrica o isobilateral. Los granos de polen son bicelulares al momento de la dehiscencia, usualmente aperturados y colpados.

El gineceo es bi-carpelar (raramente 3- o 5-locular), de ovario súpero y presenta dos lóculos. Los lóculos pueden estar secundariamente divididos por falsos septos, como en el caso de *Nicandreae* y *Datureae*. El gineceo está situado en posición oblicua respecto al plano mediano de la flor. Presentan un único estilo y un solo estigma, este último simple o bilobado. Cada lóculo lleva de 1 a 50 óvulos anátropos o hemianátropos de placentación axilar. El desarrollo del saco embrionario puede ser del tipo *Polygonum* o del tipo *Allium*. Los núcleos polares del saco embrionario se fusionan con antelación a la fertilización. Presentan 3 antípodas, usualmente efímeras, o persistentes como en el caso de *Atropa*. El fruto en las solanáceas puede ser una baya (como en el caso de *Solanum*), una drupa, o una cápsula. Las cápsulas son normalmente septicidas o, raramente, loculicidas o valvares. Las semillas son usualmente endospermadas, oleosas (raramente almidonosas), sin pelos conspicuos. El embrión, que puede ser recto a curvo, presenta dos cotiledones. Los números cromosómicos básicos van desde $x=7$ a $x=12$. Muchas especies son poliploides. ^(24, 25)

Dentro de la familia de la Solanaceas se encuentra el *Solanum albidum* Dunal (cujaca) que es una planta arbustiva de bosque secundario y se distribuye en el Perú en los departamentos de Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, La Libertad, Piura, Puno, San Martín y Ucayali. El *Solanum albidum* Dunal ha sido colectado en el departamento de Cajamarca, provincia de San Ignacio, distrito de San José de Lourdes en la localidad de El Crucero a una altitud de 790 m s n m., Coordenadas 05° 04' 41" SL y 78° 55' 39" LW. Las hojas soasadas se usan para bajar la hinchazón de los músculos por acción de contusiones o magulladuras. Las hojas calentadas en braza de leña, o ceniza caliente se aplican sobre abscesos para acelerar su maduración y permitir que drene el pus sin causar infecciones también las hojas se pasan por agua caliente, se estrujan y el jugo se aplica en cataplasmas para cicatrizar heridas. Los frutos se usan como sustitutos del jabón. Los frutos maduros o verdes se muelen y se aplican como cataplasma para desinfectar abscesos y heridas causadas por uta.

El *Solanum oblongifolium* Dunal (alcujambe) es una planta arbustiva de bosque primario: Bosque montano, se distribuye en el Perú en los departamentos de Amazonas, Cajamarca y Piura. El *Solanum oblongifolium* Dunal ha sido colectado en el departamento de Cajamarca, provincia de San Ignacio, distrito de San José de Lourdes en la localidad de Vista Hermosa a una altitud de 2150 m s n m., Coordenadas: 05° 04' 07" SL, 78° 32' 35" LW. Las hojas hervidas con ceniza de leña sirve para tratar la pechera de las acémilas (pechera se denominan a la hinchazón de la parte ventral media de las mulas, se hincha por efecto de llevar la carga muy ajustada, las fajas rozan la piel y como efecto se forma un tumor de tamaño de un plato). El sumo de las hojas frescas se aplica sobre las heridas, como cicatrizante.

2.- GLICOALCALOIDES

Los glicoalcaloides del género *Solanum* normalmente son alquilaminas esteroidales con el esqueleto C₂₇ del colestano que se encuentran en la planta en forma de glicósidos ⁽¹⁾.

Los glicoalcaloides, son derivados de esteroides, biogenéticamente muy relacionados a los triterpenoides tetracíclicos, del ciclopentanoperhidrofenantreno. Presentan punto de fusión menor a 200 °C y se encuentran frecuentemente como glicósidos en especies del género *Solanum* y otros ⁽³²⁾.

Con respecto al papel fisiológico que cumplen los glicoalcaloides, se les ha clasificado como metabolitos de estrés y se considera que son importantes en el control de algunas enfermedades por hongos ⁽²⁾ y por nematodos e insectos⁽³⁾. De acuerdo con Nishie y col. ⁽⁴⁾ la solanina produce disminución de la actividad motora en ratones, aumento del tiempo de sueño en ratones tratados con pentobarbital, cambio del trazado de electroencefalogramas y aceleración de la velocidad respiratoria en conejos, efectos inotrópicos positivos similares al glicósido cardiotónico K-estrofantósido y efecto hemolítico⁽⁵⁾.

Diversos glicoalcaloides aislados de Solanaceas como solamargina y solasonina (Ilustración 3) alteran el potencial de membrana y canales iónicos en embriones de *Xenopus laevis* ⁽³⁵⁾. Otros como alfa-chaconina (Ilustración 1) y alfa-solanina (Ilustración 2), alteran el potencial de membrana y el transporte activo de sodio en embriones de rana ^(33,34). Estas moléculas al igual que la alfa-tomatina, favorecen la pérdida de componentes celulares (iones, Ca²⁺ y proteínas), por desestabilización de la membrana celular ⁽³⁷⁾. Keukens et al., usando modelos de membranas, reportaron que los glicoalcaloides se insertan con su anillo aglicano en la membrana, mientras los azúcares forman un complejo tipo matriz, que causa la pérdida de función de barrera de la bicapa lipídica ⁽³⁶⁾.

Relación estructura actividad de los glicoalcaloides:

La actividad cardiotónica de los glicoalcaloides en el corazón aislado de la rana es determinada por la naturaleza del aglicón y el número de azúcares, pero no por la clase de azúcares o su configuración estereoquímica ⁽³⁸⁾. La potencia cardiotónica de los glicoalcaloides solanidina es como sigue:

alfa-chaconina = alfa -solanina > demissina = commersonina > beta-chaconina > solanidina.

La actividad teratogénica de la solanidina [(22S, 25R) - solanid-5en-3beta - ol] es comparable a la de los alcaloides altamente teratogénicos del Jervine ⁽³⁹⁾. Los investigadores concluyen que la actividad teratogénica se debe al par de electrones libres sin impedimentos del nitrógeno, ya que es accesible a la cara

de esteroide. Epímeros sintéticos de la solanidina [(22S, 25S) – 5alfa - solanidan-3 beta - ol y (22R, 25S) -5alfa - solanidan-3beta - ol] no eran teratogénicos, pero aumentó su absorción ⁽³⁹⁾.

La teratogenicidad en hámster puede ser estrechamente vinculada a la presencia o ausencia del enlace doble 5-6 en el alcaloide esteroidal y que este doble enlace puede ser más importante que la configuración molecular en C-22 y la colocación del átomo de nitrógeno en relación con el plano de los esteroides ⁽⁴⁰⁾.

La actividad biológica de los glicoalcaloides es influenciada por la naturaleza y número de azúcares que componen el carbohidrato atada a la posición 3-OH del aglicón, y la orientación estereoquímica de los diglicósidos de la chaconina. La embriotoxicidad generalmente decrece con el retiro de manera gradual de las unidades del azúcar de las cadenas laterales de la chacotriosa y de la solatriosa ⁽⁴¹⁾.

Basados en una incidencia similar de teratogenicidad para alfa- chaconina y alfa solanina, los autores coinciden que el oligosacárido no es requerido para causar teratogenicidad al feto ⁽⁴⁰⁾. En contraste con los glicoalcaloides, la solanidina no era tóxica a los hámsteres, por lo que la actividad lítica proporcionada por el carbohidrato es necesaria para la formación de la lesión.

La interrupción inducida glicoalcaloide-esterol en la membrana celular es específica para el tipo de glicoalcaloide y de esteroide. El orden de la potencia de los glicoalcaloides es:

alfa tomatina > alfa chaconina > alfa solanina.

En otro experimento, usando los sistemas específicos para evidenciar la interrupción de la membrana celular; las interacciones azúcar-azúcar eran evidentes por el efecto altamente sinérgico entre la alfa solanina y alfa chaconina, mejorando el efecto de filtración de los glicolípidos, así como también la pérdida casi completa de ésta actividad después de suprimir uno o más monosacáridos del glicoalcaloide ⁽⁴²⁾.

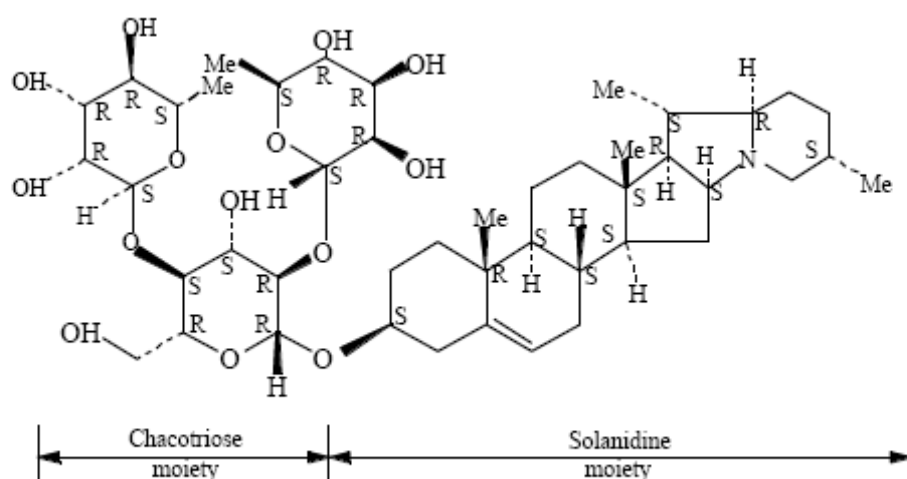


Ilustración 1.- α -Chaconina

Fuente: α -Chaconine and α -Solanine - Review of Toxicological Literature

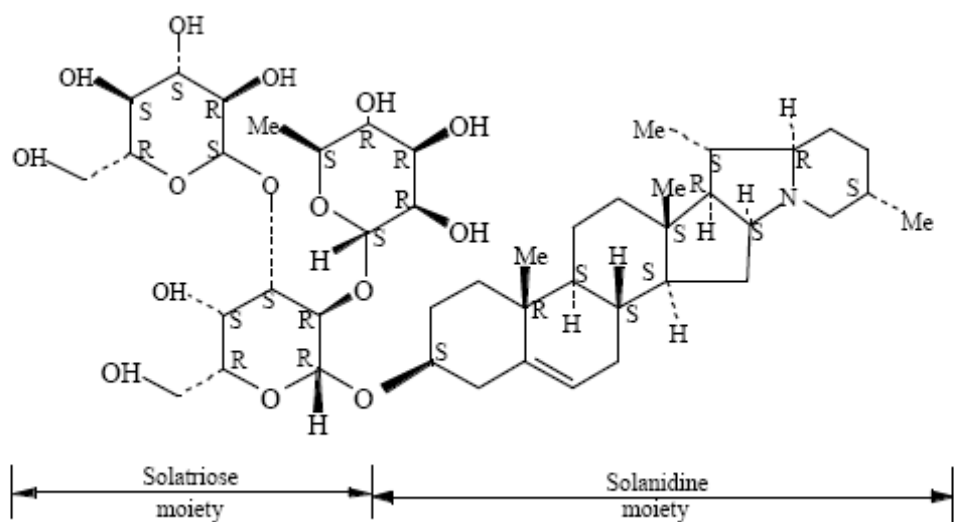


Ilustración 2.- α -Solanina

Fuente: α -Chaconine and α -Solanine - Review of Toxicological Literature

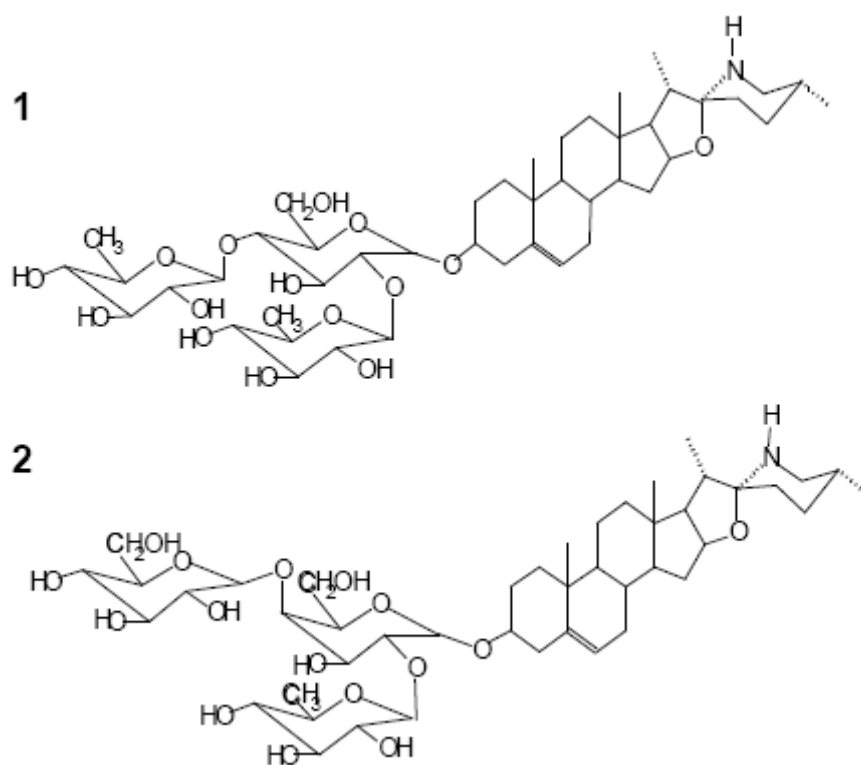


Ilustración 3 Estructura de los glicoalcaloides Solamargina (1) y Solasonina (2)
 Fuente: Rev. Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes Vol.7 N°1-4. 1998 Mérida
 Venezuela

3.- TOXICIDAD DE LOS GLICOALCALOIDES

La toxicidad de los glicoalcaloides se conoce desde hace mucho tiempo, ya desde 1918 Harris y Cockburn ⁽⁶⁾ informaron sobre intoxicaciones y muertes de humanos causadas por el consumo accidental de papa con altas concentraciones de glicoalcaloides y posteriormente se han publicado varios trabajos sobre la toxicidad de estos glicoalcaloides en humanos y animales de granja ⁽⁵⁾. La teratogeneidad de los glicoalcaloides ha causado preocupación desde que en 1972 Remwick ⁽⁷⁾ propuso sobre la base de un estudio epidemiológico comparativo que las malformaciones en humanos conocidas como anencefalia y espina bífida eran causadas por el consumo materno de papas infectadas con *Phytophthora infestans*. Aunque las malformaciones neurológicas se desmintieron en publicaciones como la de Nevin y Merret ⁽⁶⁾, en trabajos posteriores se demostró que los glicoalcaloides alpha-solanina y alpha-chaconina producen una elevada letalidad en embriones de ratas y que efectivamente estos glicoalcaloides si dan lugar a muchas malformaciones a nivel esquelético, en diferentes especies de animales ⁽⁸⁾.

Las hojas y los frutos (sobre todo los inmaduros) de casi todas las especies de las solanáceas contienen glicoalcaloides (o alcaloides glicosílicos) en especial los esteroides alpha solanina y alpha chaconina con importancia toxicológica probada (actividades anticolinesterásicas y hemolíticas en especial). Por eso esta familia botánica debe suscitar precaución, tanto en el uso culinario esporádico así como los estudios que fundamenten el uso sistemático diario en la calidad de alimentos funcionales. ^(11, 12)

Otros autores también resaltan que una menor cantidad de alpha solanina es encontrada en frutos maduros demostrando que hay concordancia en cuanto a ese aspecto fisiológico influenciando el contenido en estas plantas ^(26,27). Factores abióticos por ejemplo la radiación intensa y la temperatura elevada también aumentan los niveles de glicoalcaloides de las solanáceas ⁽²⁸⁾.

Como los glicoalcaloides son estructuralmente similares a los esteroides por su vía biosintética va del acetato al colesterol ⁽²⁷⁾. Como efecto, todos los átomos de carbono del colesterol derivan directamente del acetato ⁽²⁹⁾ y cuando un grupo hidroxilo (-OH) se liga en posición al carbono 3, el colesterol es denominado esterol ^(30,31).

En la ilustración N° 4 muestra las alteraciones metabólicas de la acetil colina influenciada por los glicoalcaloides



Ilustración 4.-Alteraciones metabólicas de la acetil colina influenciada por los glicoalcaloides

Fuente: Arq Bras Endocrinol Metab vol 48 nº 4 Agosto 2004

4.- MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLICOALCALOIDES

El análisis cuantitativo de los glicoalcaloides totales (GAT) se ha efectuado desde hace más de 70 años y con este propósito se han empleado diferentes métodos entre los cuales se pueden señalar las valoraciones volumétricas. Aunque se han empleado valoraciones volumétricas en medios acuosos, revisten mayor interés analítico las titulaciones no acuosas, entre las que se destacan el método de Fitzpatrick y Osman ⁽⁹⁾, en el cual se extraen los glicoalcaloides, se precipitan con amoníaco y el aglicón disuelto en MeOH anhidro se titula con una mezcla de azul de bromofenol al 0.067% y fenol al 10% en metanol. Este método fue modificado en 1980 por Bushway y col. ⁽¹⁰⁾ con el propósito de eliminar el proceso de hidrólisis.

El análisis cuantitativo realizado con el Titulador Automático METTLER TOLEDO DL53 con electrodo DG 115 SC (para cuantificaciones no acuosas) se fundamenta, en que el equipo encuentra el punto final de la titulación, mediante la detección del punto de equivalencia: punto de inflexión, el cual es el momento en que ocurre un cambio brusco en la variación del potencial (mV), dándonos de esta manera el volumen gastado al final en la titulación.

5.- ACTIVIDAD CITOTÓXICA EVALUADA EN ERIZO DE MAR (*TETRAPIGUS NÍGER*) SEGÚN GUSTAFSON, 1971 Y ESTUS, 1989.

Dos funciones distintas son llevadas a cabo por el acto de la fertilización: el primero tiene que ver con la iniciación de una complicada serie de cambios fisiológicos y morfológicos en el embrión. Estos cambios en las propiedades del embrión conducen al clivaje y el subsecuente desarrollo del embrión. Este aspecto de la fertilización es a menudo llamado activación. En el presente caso esta prueba es utilizada como un método indirecto para evaluar mutagenicidad y teratogenicidad en el desarrollo embrionario de erizo de mar por considerar que si hay un cambio en el proceso de diferenciación y desarrollo del embrión de erizo de mar y si las condiciones ambientales son las mismas, lo único que diferencia al grupo tratado del grupo control es el extracto de la planta, por tanto, el extracto de la planta estaría afectando el material genético de este animal causando problemas a nivel de la morfogénesis del mismo. Entre los cambios que acompañan la unión del espermatozoide y el ovocito incluyen la formación y regresión del cono de fertilización que está relacionado con la penetración del espermatozoide para formar la membrana de fertilización que claramente se puede observar al microscopio en contraste de fase.

6.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas). ^(13,14) La farmacopea americana en su capítulo general 51 Eficacia antimicrobiana; exige trabajar con los siguiente microorganismos: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Para el caso de bacterias se empleo el medio de cultivo Trypticase Soya Agar y las lecturas se realizaron a las 48 horas de incubación y para el caso de hongos y levaduras se empleó el medio Agar Sabouraud glucosado, y las lecturas se realizaron luego de 120 horas de incubación.

PARTE EXPERIMENTAL

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- COLECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

Las hojas de dos especies del género *Solanum* se colectaron en el mes de enero del 2008 en la ubicación abajo descritas:

La especie *Solanum albidum* Dunal, nombre vulgar: "Cujaca", fue colectada en el departamento de Cajamarca, provincia de San Ignacio, distrito. San José de Lourdes; localidad: El Crucero. Ubicada a una altitud de 790 m s n m. En las coordenadas: 05° 04' 41" SL y 78° 55' 39" LW.

Y la especie *Solanum oblongifolium* Dunal, nombre vulgar: "alcujambe", fue colectada en el departamento de Cajamarca, provincia de San Ignacio, distrito. San José de Lourdes, localidad: Vista Hermosa. Ubicada a una altitud de 2 150 m s n m. En las coordenadas: 05° 04' 07" SL. y 78° 32' 35" LW.

Ambas plantas, fueron previamente secadas por exposición solar, luego del cual fueron empacadas y enviadas a Lima.

Tanto la colección, el secado y transporte fue supervisado por el botánico José R. Campos de la Cruz, y clasificadas en el consultorio botánico del mismo nombre.

2.- EQUIPOS, REACTIVOS y MATERIALES

2.1.- ANALISIS FITOQUIMICO

A.- Equipos:

- Estufa HV OVENS
- Molino de cuchillas WILE MILL
- Cuba cromatográfica
- Equipo de Soxleth
- Cocinilla
- Rotavapor BUCHI R-205V805
- Balanza METTLER TOLEDO XS204
- Ultrasonido BRANSON 3510
- Titulador Automático METTLER TOLEDO DL53
- Electrodo DG 115 SC
- Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer Spectrum 100

B.- Reactivos:

- Etanol
- Acido acético glacial
- Amoniac
- N-hexano
- Metanol anhidro
- Reactivo de Dragendorff
- Azul de Bromofenol

C.- Materiales:

- Papel WHATMAN 40
- Cromatofolios TLC SILICAGEL 60F 20x20

2.2.- ACTIVIDAD CITOTOXICA

A.- Equipos

- Microscopio
- Oxigenador
- Estereoscopio
- Balanza analítica
- Sistema agitador mecánico

B.- Reactivos

- Dimetilsulfoxido (DMSO)

C.- Materiales

- Tijera
- Pipeta pasteur
- Beaker

2.3.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

A.- Equipos

- Baño Maria MEMMERT W350
- Autoclave FRAVILL AV-80L
- Refrigeradora BOSCH KSU-44
- Espectofotómetro
- Estufa esterilizadora MEMMERT ULM800
- Estufa MEMMERT U30
- Estufa BELNET
- Estufa BELNET INSTRUMENT TOR-36PID/990LT

B.- Reactivos

- Cloruro de sodio
- Acido acético
- Cepas: *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404 Lote 39281
Candida albicans ATCC® 10231 Lote 44336
Escherichia coli ATCC® 8739 Lote 48312
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 9027 Lote 48413
Salmonella entérica ATCC® 14028 Lote 36356
Staphylococcus aureus ATCC® 6538 Lote 48528
- Medios de cultivo
Agar Sabouraud glucosado Lote: 08106 marca CRITERION™
Trypticase soya Agar Lote: 07292 marca CRITERION™

C. - Materiales

- Micropipetas Brand 0,5 – 5 ml
- Micropipetas Brand 100 – 1000 ul
- Placas petri
- Tubos de ensayo
- Vortex

3.- EXTRACCIÓN DE LOS GLICOALCALOIDES

Las hojas fueron trasladadas al laboratorio en el cual fueron lavadas con agua y luego secadas en la estufa HV Ovens a una temperatura no mayor a 45°C hasta peso constante.

Las hojas secas de ambas especies se redujeron el tamaño de partícula con ayuda de un molino de cuchillas marca WILE MILL.

De la muestra molida se peso 950 g de cada especie y se colocaron en recipientes adecuados con solución extractora Etanol: Agua: Acido acético glacial (90:8:2) ⁽¹⁵⁾ hasta dos centímetros por encima de la muestra y se dejó por 15 días en maceración, protegido de la luz.

Se procedió a filtrar con algodón, luego con papel Whatman N°40 y concentrado a presión reducida en un rotavapor marca BÜCHI modelo R-205V805.

El extracto se llevó a sequedad con ayuda de la estufa HV Ovens a una temperatura no mayor a 50°C.

4.- ELIMINACIÓN DE CLOROFILA

El extracto de color verde fue despigmentado en un sistema de Soxhlet con n-hexano como solvente cuya muestra fue lavada repetidas veces con el solvente hasta que no se evidencie la coloración verde característica de la clorofila.

5.- IDENTIFICACIÓN DE LOS GLICOALCALOIDES

Para identificar los glicoalcaloides se realizó pruebas de cromatografía en capa fina utilizando cromatofólios TLC Silicagel 60F de 20 x 20 cm, como sistema de solventes se empleó cloroformo- metanol-hidroxido de amonio al 2% 2:2:1 v/v y como revelador el reactivo de Dragendorff.⁽¹⁶⁾

Para el análisis espectrofotométrico infrarrojo se trabajó la muestra por el método empleado por Sanabria⁽¹⁶⁾, para la purificación de la muestra, el cual consiste en resuspender el extracto desecado en ácido acético 5%; se centrifugó a 4 000 rpm x 20 min, se filtro al vacío, se adicionó amoniaco al 25% hasta pH 11, se calentó a 70°C x 30 min y se dejo en reposo. El precipitado se separó por centrifugación a 15 000 rpm, se redisolvió en ácido acético al 5% y se repitió el proceso, el sólido obtenido fue secado a estufa y analizado en el equipo Perkin Elmer Spectrum a una longitud de onda de 350 a 4000 cm⁻¹ y de 800 a 1000 cm⁻¹

6.- CUANTIFICACIÓN DE GLICOALCALOIDES

Se empleó el método de titulación en medio no acuoso utilizado por Fitzpatrick y Osman⁽⁹⁾, y aplicado también por Bushway y col⁽¹⁰⁾, que utiliza como solución valorante azul de bromofenol 0,067% y fenol 10% en Metanol anhidro; donde 1 mL de solución titulante equivale a 1.05 mg de Tomatina⁽¹⁶⁾

Se pesó 0.5 g aproximadamente de los glicoalcaloides totales extraídos de ambas especies en la balanza METTLER TOLEDO XSS204 y se disolvió en metanol anhidro con ayuda de un equipo ultrasonido marca Branson 3510.

Para hallar el volumen final de la titulación (gasto) se utilizó el equipo Titulador Automático METTLER TOLEDO modelo DL53 con el electrodo para titulación no acuosa DG 115 SC.

7.- BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se utilizó el método empleado por GUSTAFSON, 1971 y ESTUS, 1989., el cual permite evaluar la actividad citotóxica de diversas sustancias químicas, guiándose para ello en el desarrollo embrionario de erizos de mar.

7.1.- COLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Los erizos de mar (*Tetrapygus niger*) fueron colectados en el balneario de Ancón y fueron transportadas en condiciones naturales (temperatura 10-15°C) en agua de mar.

7.2.- OBTENCIÓN DE GAMETOS

Se abrió cuidadosamente el erizo de mar con ayuda de una tijera, haciendo una pequeña incisión en la parte dorsal y cortando en forma circular para no dañar los gametos.

El sexo del animal fue determinado por el color de los gametos extraídos de la superficie aboral (dorsal) del erizo. El esperma es cremoso y los óvulos se presentan en forma de racimos de uva de un color granate.

Los gametos femeninos de tres erizos fueron colectados, con ayuda de una pinza limpia, en un beaker con 200 mL de agua de mar fría (10°C –12°C), previamente filtrada, hasta que la solución de tiñera de un color púrpura. Se utilizó un oxigenador para mantener viables los óvulos.

Se procedió a lavar los gametos, decantando el agua sobrenadante y reemplazando con agua de mar fría con la finalidad de remover el fluido celómico, espinas rotas y restos de superficie del cuerpo. De esta manera los gametos femeninos estuvieron listos para la fertilización.

Los espermatozoides activos, son viables sólo por un tiempo limitado en agua de mar por lo que fueron colocados en una placa petri. Estos fueron obtenidos de las gónadas masculinas de dos erizos de mar.

7.3.- FECUNDACIÓN

Se agregó 11 gotas de espermatozoides con ayuda de una pipeta pasteur sobre el beacker que contiene los óvulos lavados, se mezcló suavemente con ayuda de una bagueta limpia.

Se transfirió unas gotas de la suspensión formada sobre una lámina portaobjetos; se colocó un cubreobjeto y se observó al microscopio. La presencia de un huevo de color granate rodeado de una membrana de color amarillo (membrana de fertilización) significa que el proceso de fertilización se realizó de forma correcta.

7.4.- ENFRENTAMIENTO DE LA MUESTRA CON LOS HUEVOS FECUNDADOS

Se trabajó con dos concentraciones de glicoalcaloides: 0.055 mg/mL y 0.11 mg/mL, para cada especie de *Solanum*, con agua de mar filtrada más 10 µL de DMSO por cada vial para ayudar en la solubilidad de los glicoalcaloides. Se trabajo con un control del DMSO y un blanco para evaluar el desarrollo embrionario.

Se acondicionó seis viales, en los cuales se le adicionó 2 mL de la suspensión de huevos recién fecundados.

Posteriormente, del primer al cuarto vial se le agrega 1 mL de la muestras de glicoalcaloides preparadas a las dos concentraciones.

Al quinto vial se le agrega 1 mL de agua de mar filtrada más 10 µL de DMSO que corresponde al control

Y por último al sexto vial se le agregó 1 mL de agua de mar filtrada para evaluar el desarrollo embrionario. Todo lo expuesto anteriormente se trabajó por triplicado.

Los viales se colocaron en una plataforma con agitación mecánica y dentro de una cámara de frío de 8°C a 15°C.

Se procedió a evaluar el desarrollo embrionario de los erizos de mar con ayuda de un estereoscopio a las 24, 48 y 72 horas.

8.- ENSAYO ANTIMICROBIANO

8.1.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL

Para la utilización de las cepas se empleó el método “Recuperación Microbiológica en Placa” empleado por el área de microbiología del laboratorio IQfarma SA código TM093 Rev 00.

Los medios de cultivo Tripticasa de Soya Agar y Agar Sabouraud Glucosado fueron preparados en un Baño Maria Memmert W350 luego de los cuales fueron esterilizados en la autoclave Fravill AV-80L y colocados hasta su uso en la refrigeradora Bosch KSU-44.

Los materiales de vidrio fueron esterilizados en la estufa esterilizadora Memmert ULM 800 y guardados en un recipiente adecuado hasta su uso.

8.2.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se preparó una solución inicial al 1% de glicoalcaloides totales de *Solanum albidum* y otra similar de glicoalcaloides totales de *Solanum oblongifolium*, disueltos en solución fisiológica (cloruro de sodio 0.9%) estéril con 1 mL de ácido acético 0.1N para ayudar a la solubilidad; a partir de éstos se preparó por duplicado una batería de tubos de ensayo con soluciones al 0.500%; 0.250%; 0.100%; 0.075%; 0.050%; 0.025% y 0.010% completando a 10 mL con solución fisiológica estéril como solvente. Homogenizando las diluciones con la ayuda de un vortex.

8.3.- ENFRENTAMIENTO CON LOS MICROORGANISMOS

Las muestras de glicoalcaloides preparados en las concentraciones descritas fueron enfrentadas por 30 minutos y por 24 horas con 1 mL de cepas de cuatro especies de bacterias, una especie de hongo y una levadura.

- *Escherichia coli* ATCC® 8739
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027
- *Salmonella enterica* ATCC® 14028
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404
- *Candida albicans* ATCC® 10231

Trascurrido este tiempo, se colocó 1 mL de la solución de enfrentamiento sobre una placa petri y se agregó para el caso de bacterias Tripticasa Soya Agar y para el caso de hongos y levaduras se agregó Agar Sabouraud Glucosado.

Se trabajó una muestra control para hallar el número de colonias de las bacterias, hongos y levaduras empleados en el ensayo. Para esto se utilizó la escala de MAC FARLAND para hallar la dilución a la cual se pueda contar las colonias en placa para un 1mL de cepa.

Se colocó 1 mL de cada cepa empleada sobre una placa petri y se agregó el agar correspondiente para el crecimiento de cada microorganismo.

Las placas que contienen Tripticasa Soya Agar fueron colocadas en la estufa Memmert U30 (Estufa N° 1) a una temperatura de trabajo de 34,5°C a 37,0°C

Las placas que contiene Agar Sabouraud Glucosado se colocó en la estufa Belnet Instruments CC-ES-32 (Estufa N°2) a una temperatura de 22.5°C \pm 0.5°C.

Para descartar la interacción del solvente, se trabajó un control con ácido acético con las condiciones anteriormente descritas.

También se trabajó un control negativo para evaluar la esterilidad de los medios de cultivo, los cuales fueron incubados en la estufa Belnet Instrument TOR-36 PID/990LT (estufa N° 5) a una temperatura de trabajo de 32,5 °C \pm 1 °C la cual está destinada únicamente para controles negativos.

Se procedió a realizar las lecturas de las placas trascurrida las 48 horas de incubación para las bacterias y las 120 horas de incubación para los hongos y levaduras. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

V.- RESULTADOS

1.- ESTUDIO TAXONÓMICO

El material vegetal fue determinado científicamente en el consultorio botánico José R. Campos de la Cruz de la siguiente manera (Anexo 1 y 2)

Nombre vulgar: “Cujaca”

REYNO: PLANTAE

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Solanum* L.

ESPECIE: *Solanum albidum*_Dunal

Nombre vulgar: “alcujambe”

REYNO: PLANTAE

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Solanum* L.

ESPECIE: *Solanum oblongifolium*_Dunal

José R. Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Teléfono: 537 3629
e-mail: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, Biólogo Colegiado, CBP 3796.

Certifica que:

JHONNY SMIT OLORTEGUI QUIROZ y
MARY CARMEN BRAÑEZ ESPINOZA

Bachilleres en Farmacia y Bioquímica, egresados de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, han solicitado la determinación científica de una planta conocida con los nombre vulgar de “cujaca”; la muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: Solanum albidum Dunal. Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	:	PLANTAE
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SOLANALES
FAMILIA	:	SOLANACEAE
GENERO	:	<u>Solanum</u> L.
ESPECIE	:	<u>Solanum albidum</u> Dunal

Nombre vulgar: “Cujaca”

Se expide la presente certificación para los fines que estimen conveniente.

Lima, 07 de febrero del 2008




José R. Campos De la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva N° 156. Urbanización Santa Luzmila-Lima

José R. Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Teléfono: 537 3629
e-mail: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, Biólogo Colegiado, CBP 3796.

Certifica que:

JHONNY SMIT OLORTEGUI QUIROZ y
MARY CARMEN BRAÑEZ ESPINOZA.

Bachilleres en Farmacia y Bioquímica, egresados de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, han solicitado la determinación científica de una planta conocida con el nombre vulgar de "**alcujambe**"; la muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: *Solanum oblongifolium* Dunal. Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: PLANTAE
DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: ASTERIDAE
ORDEN	: SOLANALES
FAMILIA	: SOLANACEAE
GENERO	: <u><i>Solanum</i></u> L.
ESPECIE	: <u><i>Solanum oblongifolium</i></u> Dunal

Nombre vulgar: "**alcujambe**".

Se expide la presente certificación para los fines que estimen conveniente.

Lima, 07 de febrero del 2008


José R. Campos De la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva N° 156. Urbanización Santa Luzmila-Lima

2.- ESTUDIO FITOQUÍMICO

La cromatografía en capa fina dió una mancha anaranjada grande a un Rf de 0.92. (Ilustración 5)



Ilustración 5.- Cromatoplasmas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal revelados con el reactivo de Dragendorff

El análisis espectrofotométrico se mostro como sigue: Los espectros infrarrojo de *Solanum oblongifolium* Dunal (espectro 1 y 2) y de *Solanum albidum* Dunal (espectro 3 y 4) muestran una banda ancha a 3300 cm^{-1} y en la región de 900 a 1000 cm^{-1} muestran cuatro picos a 982 , 923 , 899 y 864 cm^{-1}

3.- CUANTIFICACIÓN DE LOS GLICOALCALOIDES

Para la cuantificación de los glicoalcaloides se utilizó como solución valorante azul de Bromofenol 0.067% más fenol 10% en metanol anhidro y un Titulador Automático METTLER TOLEDO modelo DL53 con electrodo DG 115 SC.

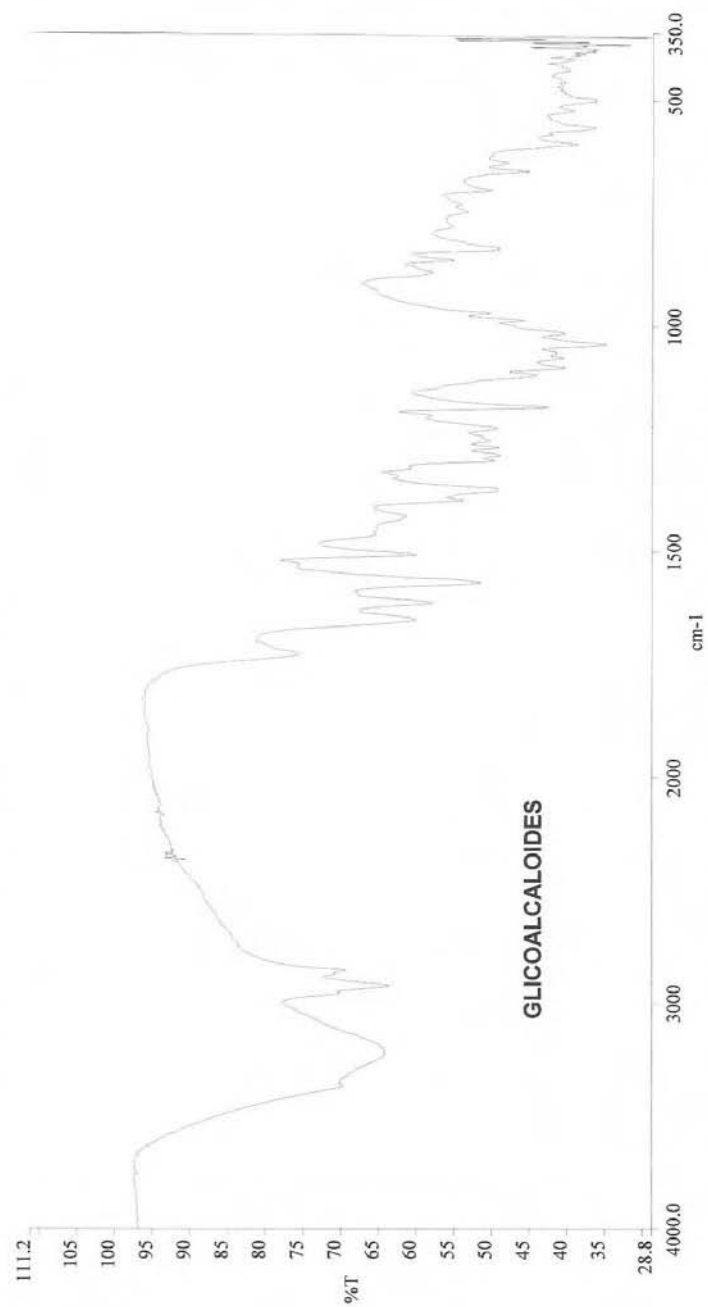
Se utilizó la equivalencia: 1 mL de solución titulante equivale a 1.05 mg de tomatina ⁽¹⁶⁾.

Los pesos y el gasto emitido por el equipo titulador automático Metter Toledo DL53 se puede evidenciar en el anexo 3 y 4.

Espectro N° 1: Espectro de 4000.0 a 350.0 cm-1 de Glicoalcaloides de las hojas de Solanum oblongifolium Dunal

LABORATORIO TRIFARMA S.A

IDENTIFICACION GLICOALCALOIDES



— Solanum oblongifolium Dunal .sp - 23/10/2008 - Glicoalcaloides Esteroidales Total

ESPECTRO 1

ANALISTA: MARY BRAÑEZ ESPINOZA

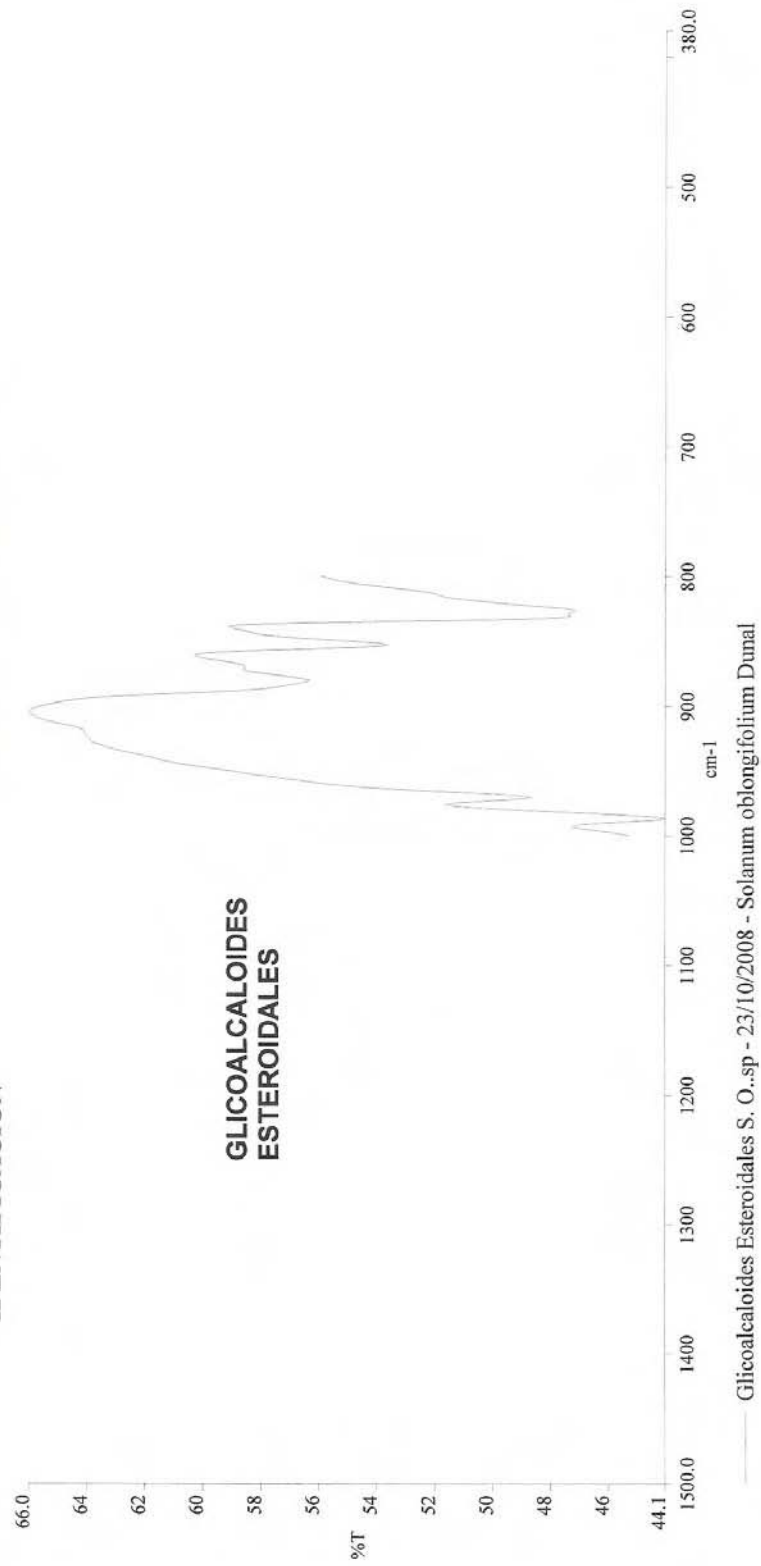
Date: Jueves, 23 de Octubre de 2008

Espectro N° 2: Espectro de 1000.0 a 800.0 cm⁻¹ de Glicoalcaloides Esteroidales S. O...sp.

LABORATORIO TRIFARMA S.A

GLICOALCALOIDES

IDENTIFICACION



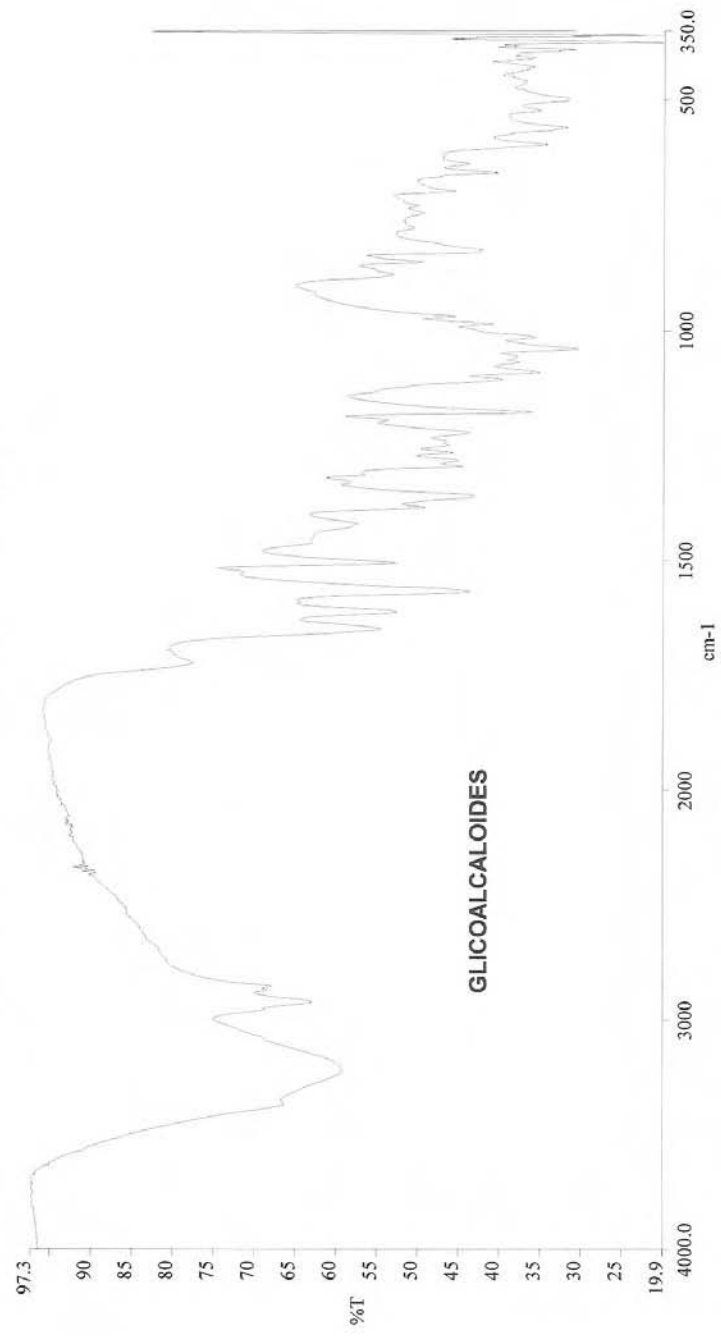
ESPECTRO 2

ANALISTA: MARY BRAÑEZ ESPINOZA

Espectro N° 3: Espectro de 4000.0 a 350.0 cm-1 de Glicoalcaloides Esferoidales Total.sp.

LABORATORIO TRIFARMA S.A

IDENTIFICACION GLICOALCALOIDES



— Glicoalcaloides Esferoidales Total.sp - 23/10/2008 - Solanum albidum Dunal

ESPECTRO 3

ANALISTA: MARY BRAÑEZ ESPINOZA

Date: Jueves, 23 de Octubre de 2008

Espectro N° 4: Espectro de 1000.0 a 800.0 cm^{-1} de Glicoalcaloides Esteroidales .sp.

LABORATORIO IKTAKIMA S.A

GLICOALCALOIDES

IDENTIFICACION



ESPECTRO 4

ANALISTA: MARY BRAÑEZ ESPINOZA

Cuantificación de glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal

Cuadro Nº 1 Cuantificación de glicoalcaloides en *Solanun albidum* Dunal

	Peso de la muestra (W)	Gasto del titulante (mL)	mg de glicoalcaloides	% mg de glicoalcaloides	Promedio/ RSD
1	0.5004 g	6.9464 mL	7.29372 mg	1457,6 %	X= 1459,4 mg % RSD: 0.117%
2	0.5004 g	6.9562 mL	7.30401 mg	1459,6 %	
3	0.5005 g	6.9640 mL	7.3122 mg	1461,0 %	

Se obtuvo 10,276 g de muestra concentrada desecada.

$$1459,4 \text{ mg \%} \times 10,276 \text{ g} = 149,9679 \text{ mg}$$

Se partió de 950 g de muestra desecada

$$149,9679 \text{ mg} \longrightarrow 950 \text{ g}$$

$$X \longrightarrow 100 \text{ g}$$

$X = 15,786 \text{ mg\%}$

METTLER TOLEDO DL53 V2.4
DL53 C.C.

Método: PT77 Glicoalcaloides
Hora de inicio: 24/06/2008 06:00 p.m.

24/06/2008 05:50 p.m.

Datos de la muestra

Nº	Observación / ID	Hora de inicio	Cantidad muestra	F corr.
1	Dosaje	24/06/2008 06:00 p.m.	0.5004 g	1.0
2	Dosaje	24/06/2008 06:04 p.m.	0.5004 g	1.0
3	Dosaje	24/06/2008 06:08 p.m.	0.5005 g	1.0

Resultados

Nº	Observación / ID	Hora de inicio	Cantidad de muestra y resultados		
1	Dosaje	24/06/2008 06:00 p.m.	0.5004 g		
			R1 = 6.9464 mL	Gasto	
2	Dosaje	24/06/2008 06:04 p.m.	0.5004 g		
			R1 = 6.9562 mL	Gasto	
3	Dosaje	24/06/2008 06:08 p.m.	0.5005 g		
			R1 = 6.9640 mL	Gasto	

Nota sobre la serie

PRODUCTO: Solanum albidum

Estadística

Rx	Nombre	n	Media	Unidad	s	srel [%]
R1	Gasto	3	6.9555	mL	0.008819	0.127

Cuantificación de glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal

**Cuadro N° 2 Cuantificación de glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium*
Dunal**

	Peso de la muestra (W)	Gasto del titulante (mL)	mg de glicoalcaloides	mg % de glicoalcaloides	Promedio/ RSD
1	0.5003 g	6.9476 mL	7.29498 mg	1458,1 mg %	X= 1459.3 mg% RSD: 0.082%
2	0.5002 g	6.9514 mL	7.29897 mg	1459.2 mg %	
3	0.5003 g	6.9587 mL	7.306635 mg	1460.5 mg %	

Se obtuvo 9.951 g de muestra concentrada desecada.

$$1459,3 \text{ mg \%} \times 9,951 \text{ g} = 145,2149 \text{ mg}$$

Se partió de 950 g de muestra desecada

$$145,2149 \text{ mg} \longrightarrow 950 \text{ g}$$

$$X \longrightarrow 100 \text{ g}$$

$X = 15,286\text{mg\%}$

4.- BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Desarrollo embrionario de erizos de mar luego de 24, 48 y 72 horas.

Cuadro Nº 3: Lectura del blanco luego de 24 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
B1	9.95	90.05	0.00	0.00	100.00
B2	6.95	93.05	0.00	0.00	100.00
B3	6.40	93.60	0.00	0.00	100.00
PROMEDIO	7.77	92.23	0.00	0.00	100.00
		Vivos	92.23		

Cuadro Nº 4: Lectura del blanco luego de 48 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
B1	9.56	5.22	85.22	0	100
B2	7.01	3.25	89.74	0	100
B3	6.25	7.26	86.49	0	100
PROMEDIO	7.61	5.24	87.15	0	100
		Vivos	92.39		

B1: Blanco 1; B2 Blanco 2; B3: Blanco 3.

Mórula, Blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Cuadro N° 5: Lectura del blanco luego de 72 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
B1	10.11	0.00	45.23	44.66	100.00
B2	9.56	0.00	44.23	46.21	100.00
B3	8.62	0.00	39.56	51.82	100.00
PROMEDIO	9.43	0.00	43.01	47.56	100.00
		Vivos	90.57		

B1: Blanco 1; B2 Blanco 2; B3: Blanco 3.

Mórula, Blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Efecto del solvente (control) sobre el desarrollo embrionario de erizos de mar

Cuadro N° 6 Lectura del control a las 24 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
DMSO1	18.36	81.64	0.00	0.00	100.00
DMSO2	17.26	82.74	0.00	0.00	100.00
DMSO3	16.04	83.96	0.00	0.00	100.00
PROMEDIO	17.22	82.78	0.00	0.00	100.00
		Vivos	82.78		

Cuadro N° 7 Lectura del control a las 48 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
DMSO1	18.22	4.63	77.15	0.00	100.00
DMSO2	17.63	0.75	81.62	0.00	100.00
DMSO3	16.24	3.28	80.48	0.00	100.00
PROMEDIO	17.36	2.89	79.75	0.00	100.00
		vivos	82.64		

DMSO: Dimetilsulfóxido

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Cuadro Nº 8 Lectura del control a las 72 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
DMSO1	18.93	0.00	40.23	40.85	100.00
DMSO2	18.00	0.00	39.52	42.48	100.00
DMSO3	16.52	0.00	42.26	41.22	100.00
PROMEDIO	17.82	0.00	40.67	41.51	100.00
		vivos	82.18		

DMSO: Dimetilsulfóxido

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal sobre el desarrollo embrionario de erizos de mar

- Glicoalcaloides extraídos de las hojas de *Solanum albidum* Dunal a 0.055mg/mL de concentración

Cuadro Nº 9.- Lectura a las 24 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S albidum 1	70.85	29.15	0.00	0	100.00
S albidum 2	72.19	27.81	0.00	0	100.00
S albidum 3	69.59	30.41	0.00	0	100.00
PROMEDIO	70.88	29.12	0.00	0.00	100.00

vivos 29.12

Cuadro Nº 10 .- Lectura a las 48 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S albidum1	62.45	10.52	27.03	0	100.00
S albidum2	67.55	9.26	23.19	0	100.00
S albidum3	69.33	10.65	20.02	0	100.00
PROMEDIO	66.44	10.14	23.41	0.00	100.00

vivos 33.56

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Cuadro N° 11.- Lectura a las 72 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S albidum1	51.52	21.00	27.48	0.00	100.00
S albidum2	52.36	21.10	26.54	0.00	100.00
S albidum3	50.48	24.64	24.88	0.00	100.00
PROMEDIO	51.45	22.25	26.30	0.00	100.00
		vivos 48.55			

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

- Glicoalcaloides extraídos de las hojas de *Solanum albidum* Dunal a 0.11mg/mL de concentración.

Cuadro Nº 12.- Lectura a las 24 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S albidum1	89.77	10.23	0.00	0	100.00
S albidum2	87.48	12.52	0.00	0	100.00
S albidum3	88.75	11.25	0.00	0	100.00
PROMEDIO	88.67	11.33	0.00	0.00	100.00

vivos= 11.33

Cuadro Nº 13.- Lectura a las 48 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S albidum1	85.62	10.62	3.76	0	100.00
S albidum2	86.25	10.24	3.51	0	100.00
S albidum3	82.56	9.65	7.79	0	100.00
PROMEDIO	84.81	10.17	5.02	0.00	100.00

vivos 15.19

Mórula, Blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Cuadro Nº 14.- Lectura a las 72 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTOS (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S albidum1	84.22	10.58	5.20	0.00	100.00
S albidum2	83.65	10.19	6.16	0.00	100.00
S albidum3	85.32	10.20	4.48	0.00	100.00
PROMEDIO	84.40	10.32	5.28	0.00	100.00
		vivos 15.60			

Mórula, Blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum oblongifolium* Dunal sobre el desarrollo embrionario de erizos de mar

- Glicoalcaloides extraídos de las hojas de *Solanum oblongifolium* a 0.055mg/mL de concentración

Cuadro Nº 15.- Lecturas a las 24 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTO (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S Oblongifolium1	70.25	29.75	0.00	0	100.00
S Oblongifolium2	71.25	28.75	0.00	0	100.00
S Oblongifolium3	72.62	27.38	0.00	0	100.00
PROMEDIO	71.37	28.63	0.00	0.00	100.00

vivos= 28.63

Cuadro Nº 16.- Lecturas a las 48 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTO (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S Oblongifolium1	64.21	11.52	24.27	0	100.00
S Oblongifolium2	65.23	10.93	23.85	0	100.00
S Oblongifolium3	61.05	9.65	29.30	0	100.00
PROMEDIO	63.50	10.70	25.81	0.00	100.00

vivos= 36.50

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Cuadro Nº 17.- Lecturas a las 72 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTO (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S Oblongifolium1	47.63	23.73	28.65	0	100.00
S Oblongifolium2	46.25	24.13	29.62	0	100.00
S Oblongifolium3	50.62	24.15	25.23	0	100.00
PROMEDIO	48.17	24.00	27.83	0.00	100.00
		vivos= 51.83			

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

- Glicoalcaloides extraídos de las hojas de *Solanum oblongifolium* a 0.11mg/mL de concentración.

Cuadro Nº 18.- Lectura a las 24 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTO (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S Oblongifolium1	81.25	18.75	0	0	100.00
S Oblongifolium2	85.62	14.38	0	0	100.00
S Oblongifolium3	84.62	15.38	0	0	100.00
PROMEDIO	83.83	16.17	0	0.00	100.00
		vivos= 16.17			

Cuadro Nº 19.- Lectura a las 48 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTO (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S Oblongifolium1	78.52	10.51	10.97	0	100.00
S Oblongifolium2	79.56	10.95	9.49	0	100.00
S Oblongifolium3	80.25	10.68	9.07	0	100.00
PROMEDIO	79.44	10.71	9.84	0.00	100.00
		vivos= 20.56			

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Cuadro Nº 20.- Lectura a las 72 horas

MUESTRA	MORULA/ MUERTO (%)	BLASTULA (%)	GASTRULA (%)	PLUTEUS TARDIO (%)	TOTAL
S Oblongifolium1	77.56	12.56	9.88	0	100.00
S Oblongifolium2	70.25	11.52	18.23	0	100.00
S Oblongifolium3	75.25	13.52	11.23	0	100.00
PROMEDIO	74.35	12.53	13.11	0.00	100.00

vivos= 25.65

Mórula, blástula, gástrula y pluteus tardío: primera, segunda, tercera y cuarta fase del desarrollo embrionario del erizo de mar, respectivamente

Cuadro Nº 21.- Relación de embriones viables y no viables por acción de los glicoalcaloides a la concentración de 0.055 mg/mL

	24 horas		48 horas		72 horas	
	Muertos	vivos	muertos	vivos	muertos	vivos
<i>S. albidum</i>	70.88	29.12	66.44	33.56	51.45	48.55
<i>S. oblongifolium</i>	71.37	28.63	63.50	36.50	48.17	51.83
Blanco	7.77	92.23	7.61	92.39	9.43	90.57
DMSO	17.22	82.78	17.36	82.64	17.82	82.18

Gráficos en el cual se expresan el porcentaje de erizos vivos y muertos por acción de los glicoalcaloides a una concentración de 0.055 mg/mL

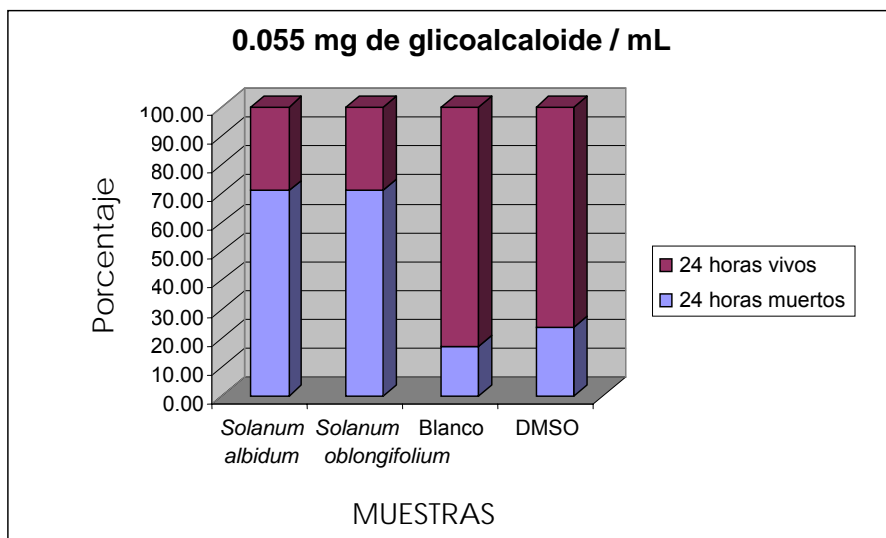


Grafico 1.- Porcentaje de erizos vivos y muertos luego de 24 horas por acción de los glicoalcaloides de *S. albidum* y *S. oblongifolium* a la concentración de 0.055mg/mL comparado con el blanco y el control (DMSO)

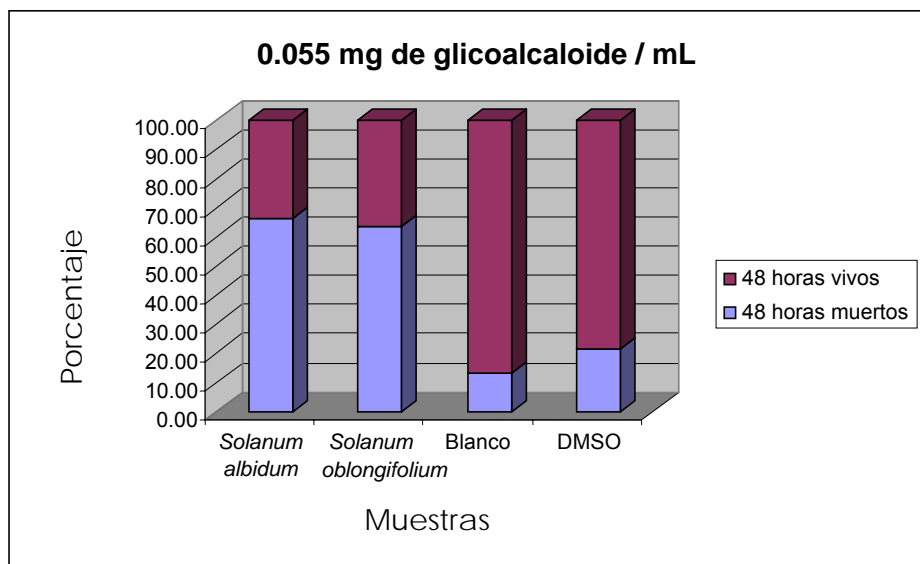


Grafico 2.- Porcentaje de erizos vivos y muertos luego de 48 horas por acción de los glicoalcaloides de *S. albidum* y *S. oblongifolium* a la concentración de 0.055mg/mL comparado con el blanco y el control (DMSO)

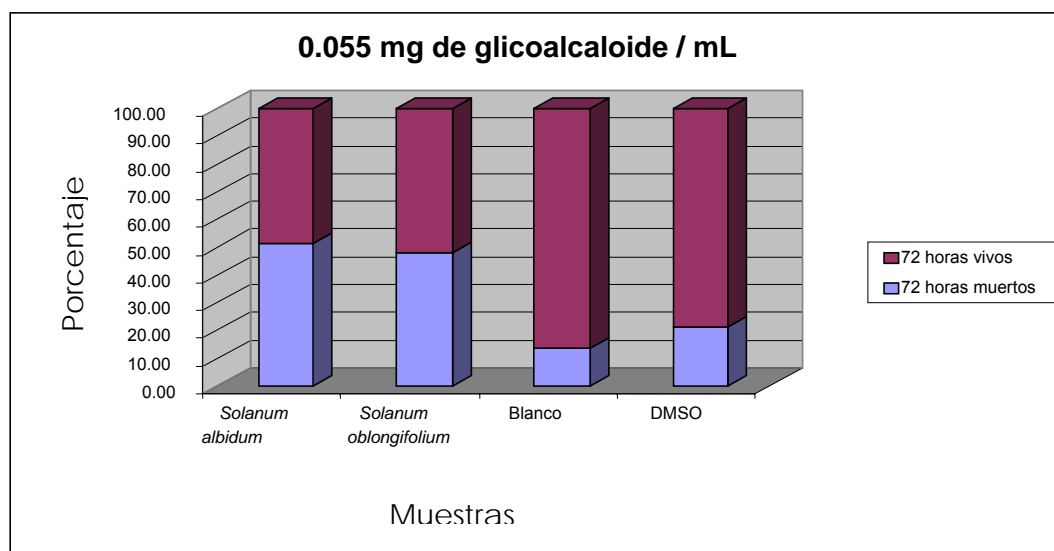


Grafico 3.- Porcentaje de erizos vivos y muertos luego de 72 horas por acción de los glicoalcaloides de *S. albidum* y *S. oblongifolium* a la concentración de 0.055mg/mL comparado con el blanco y el control (DMSO)

Cuadro Nº 22.- Relación de embriones viables y no viables por acción de los glicoalcaloides a la concentración de 0.11 mg/ml

	24 horas		48 horas		72 horas	
	mueritos	vivos	mueritos	vivos	mueritos	vivos
<i>S. albidum</i>	86.67	11.33	84.81	15.19	84.40	15.60
<i>S. oblongifolium</i>	83.83	16.17	79.44	20.56	74.35	25.65
Blanco	7.77	92.23	7.61	92.39	9.43	90.57
DMSO	23.75	76.25	21.42	78.58	21.46	78.54

Gráficos en el cual se expresan el porcentaje de erizos vivos y muertos por acción de los glicoalcaloides a una concentración de 0.11 mg/mL

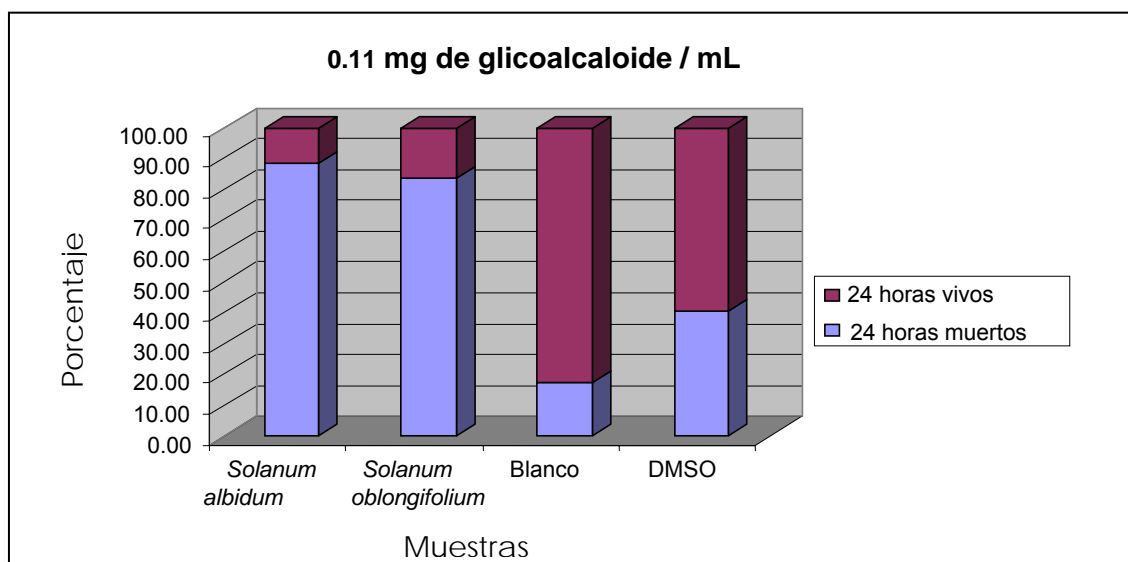


Gráfico 4.- Porcentaje de erizos vivos y muertos luego de 24 horas por acción de los glicoalcaloides de *S. albidum* y *S. oblongifolium* a la concentración de 0.11 mg/mL comparado con el blanco y el control (DMSO)

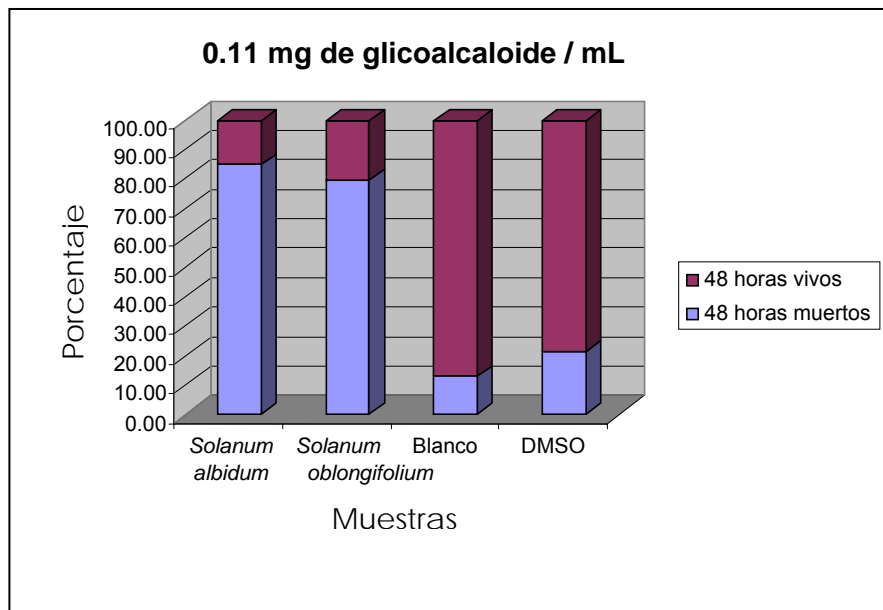


Grafico 5.- Porcentaje de erizos vivos y muertos luego de 48 horas por acción de los glicoalcaloides de *S. albidum* y *S. oblongifolium* a la concentración de 0.11 mg/mL comparado con el blanco y el control (DMSO)

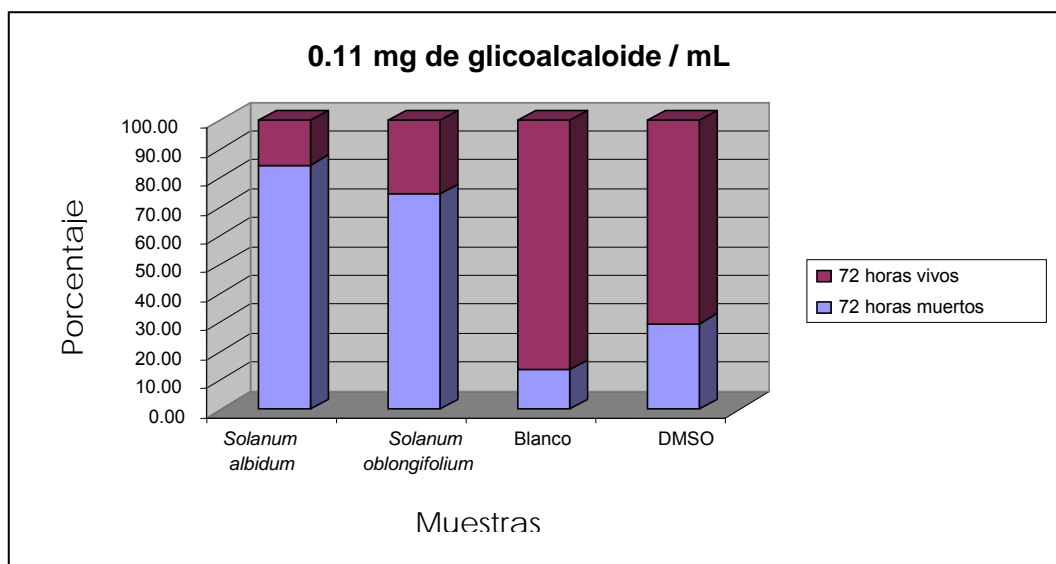


Grafico 6.- Porcentaje de erizos vivos y muertos luego de 72 horas por acción de los glicoalcaloides de *S. albidum* y *S. oblongifolium* a la concentración de 0.11 mg/mL comparado con el blanco y el control (DMSO)

5.- ENSAYO ANTIMICROBIANO

Cuadro N°23.- Efecto del solvente sobre el crecimiento de los microorganismos trabajado a diferentes concentraciones, comparado con un control, trabajado en las mismas condiciones. Resultados expresados en ufc/mL

	Concentración trabajadas con el solvente							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ® 6538	22 x 10 ⁸	22 x 10 ⁸	22 x 10 ⁸	22 x 10 ⁸	22 x 10 ⁸	22 x 10 ⁸	22 x 10 ⁸	22 x 10 ⁸
<i>Salmonella entérica</i> ATCC ® 14028	36 x 10 ⁸	36 x 10 ⁸	36 x 10 ⁸	36 x 10 ⁸	36 x 10 ⁸	36 x 10 ⁸	36 x 10 ⁸	36 x 10 ⁸
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC ® 9027	34 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 8739	52 x 10 ⁸	52 x 10 ⁸	52 x 10 ⁸	52 x 10 ⁸	52 x 10 ⁸	52 x 10 ⁸	52 x 10 ⁸	52 x 10 ⁸
<i>Candida albicans</i> ATCC ®10231	20 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC ® 16404	80 x 10 ²	80 x 10 ²	80 x 10 ²	80 x 10 ²	80 x 10 ²	80 x 10 ²	80 x 10 ²	80 x 10 ²

5.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS GLICOALCALOIDES DE *Solanum albidum* DUNAL

Cuadro N°24.- Efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 30 min de enfrentamiento. Resultados expresados en ufc/mL

	Concentración de glicoalcaloides de <i>Solanum albidum</i> Dunal							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ® 6538	0	0	139	1720	70×10^7	70×10^7	70×10^7	70×10^7
<i>Salmonella entérica</i> ATCC ® 14028	0	0	20	396	953	14×10^8	14×10^8	14×10^8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC ® 9027	0	0	0	10	835	10×10^8	10×10^8	10×10^8
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 8739	0	0	660	931	40×10^7	40×10^7	40×10^7	40×10^7
<i>Candida albicans</i> ATCC ®10231	0	0	32	356	65×10^6	65×10^6	65×10^6	65×10^6
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC ® 16404	0	0	0	39	125	5000	5000	5000

Con la finalidad de graficar la curva de inhibición del crecimiento para cada microorganismo, se optó por obtener el logaritmo a los resultados del Cuadro N°24

Cuadro N°25.- Logaritmo de los resultados del efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 30 min de enfrentamiento, obtenidos en el Cuadro N°24

	Concentración de glicoalcaloides de <i>Solanum albidum</i> Dunal							Control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>S. aureus</i> ATCC ® 6538	0.000	0.000	2.143	3.236	8.845	8.845	8.845	8.845
<i>S. entérica</i> ATCC ® 14028	0.000	0.000	1.301	2.598	2.979	9.146	9.146	9.146
<i>P. aeruginosa</i> ATCC ® 9027	0.000	0.000	0.000	0.000	2.922	9.000	9.000	9.000
<i>E. coli</i> ATCC ® 8739	0.000	0.000	2.820	2.969	8.602	8.602	8.602	8.602
<i>C. albicans</i> ATCC ®10231	0.000	0.000	1.505	2.551	7.813	7.813	7.813	7.813
<i>A. brasiliensis</i> ATCC ® 16404	0.000	0.000	0.000	1.591	2.097	3.699	3.699	3.699

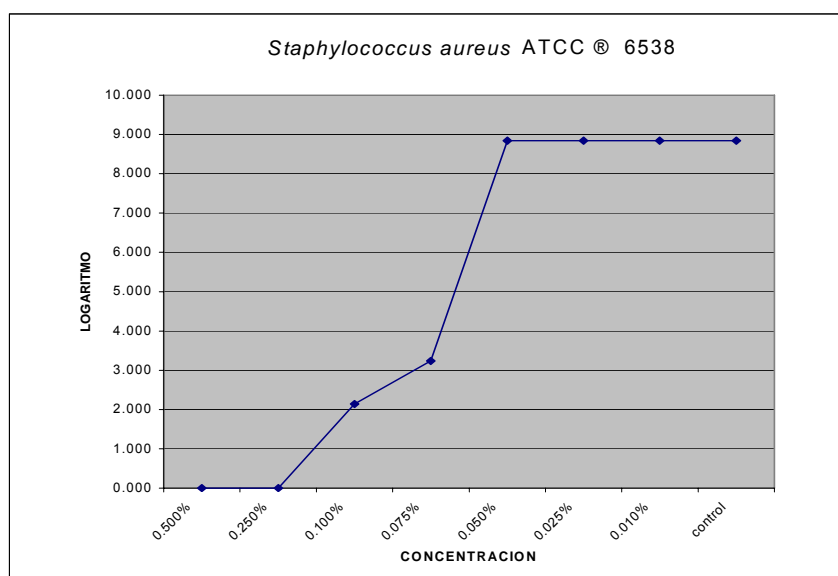


Grafico 7.- Curva del desarrollo de *Staphylococcus aureus* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

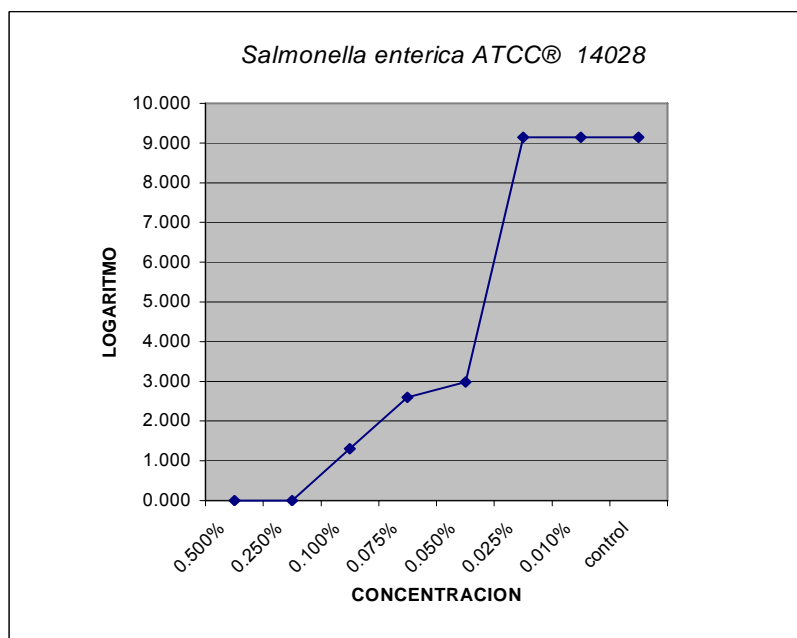


Grafico 8.- Curva del desarrollo del *Salmonella enterica* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

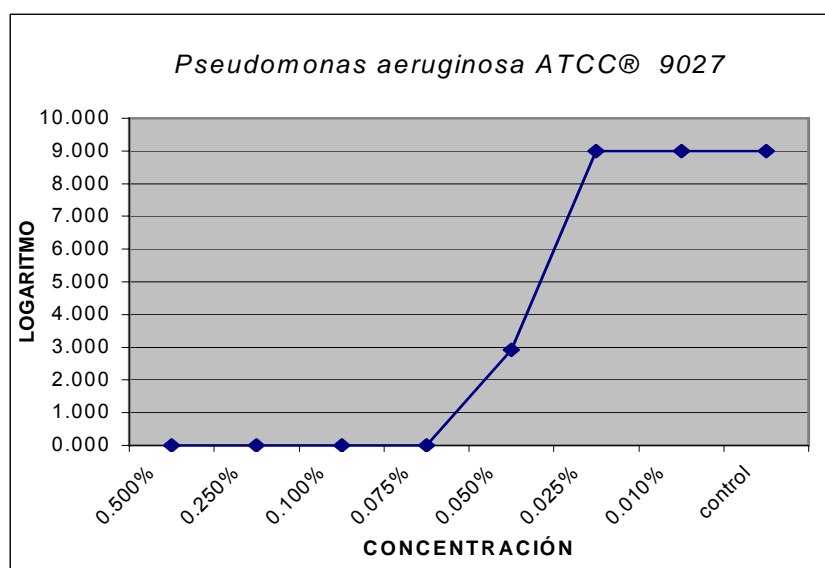


Grafico 9.- Curva del desarrollo del *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

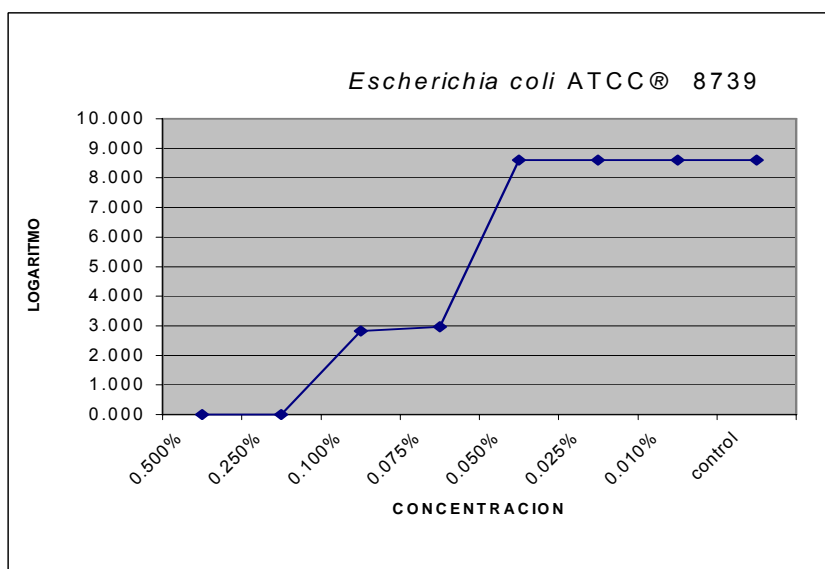


Grafico 10.- Curva del desarrollo del *Escherichia coli* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

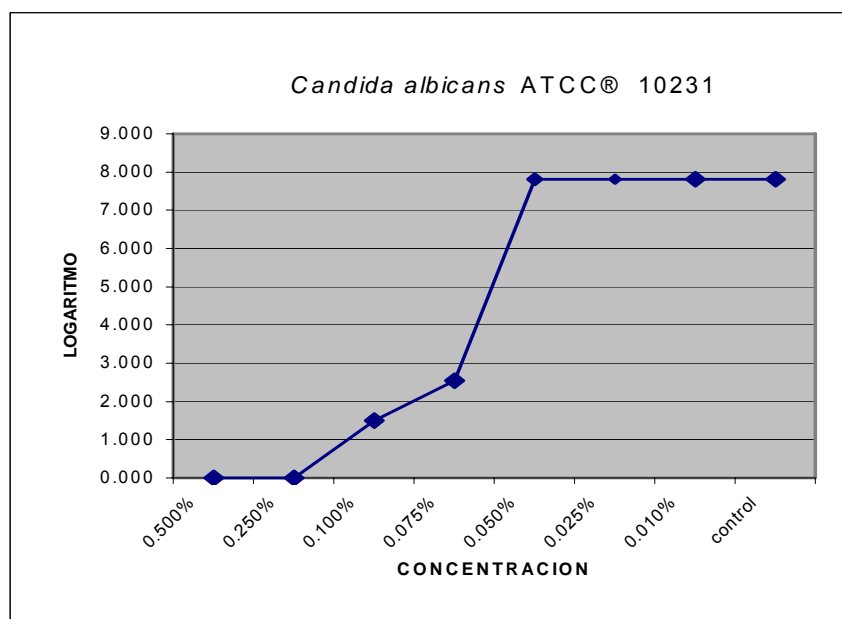


Grafico 11.- Curva del desarrollo del *Candida albicans* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

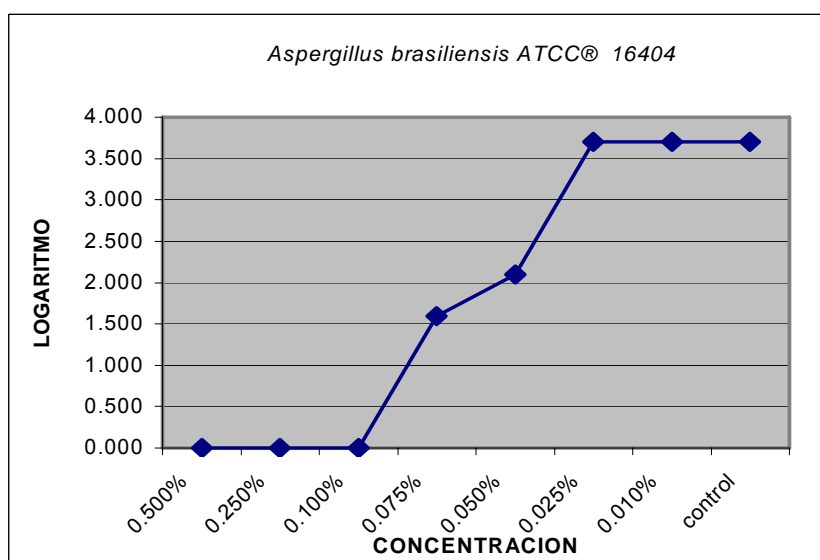


Grafico 12.- Curva del desarrollo del *Aspergillus brasiliensis* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

Cuadro N°26.- Efecto de los glicoalcaloides extraídos de las hojas de *Solanum albidum* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 24 horas de enfrentamiento. Resultados expresados en ufc/mL.

	Concentración de glicoalcaloides de <i>Solanum albidum</i> Dunal							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538	0	0	0	0	0	23	7×10^8	7×10^8
<i>Salmonella enterica</i> ATCC® 14028	0	0	0	0	0	249	14×10^8	14×10^8
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC® 9027	0	0	0	0	0	0	10×10^8	10×10^8
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739	0	0	0	0	0	172	4×10^8	4×10^8
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	0	0	0	5	421	65×10^6	65×10^6	65×10^6
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404	0	0	0	0	0	22	345	5000

Con la finalidad de graficar la curva de inhibición del crecimiento para cada microorganismo, se optó por obtener el logaritmo a los resultados del Cuadro N°26.

Cuadro N°27.- Logaritmo de los resultados del efecto de los glicoalcaloides extraídos de las hojas de *Solanum albidum* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 24 horas de enfrentamiento, obtenidos en el Cuadro N°26.

	Concentración de glicoalcaloides de <i>Solanum albidum</i> Dunal							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ® 6538	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.362	8.845	8.845
<i>Salmonella enterica</i> ATCC ® 14028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.396	9.146	9.146
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC ® 9027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	9.000	9.000
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 8739	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.236	8.602	8.602
<i>Candida albicans</i> ATCC ®10231	0.000	0.000	0.000	0.699	2.624	7.813	7.813	7.813
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC ® 16404	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.342	2.538	3.699

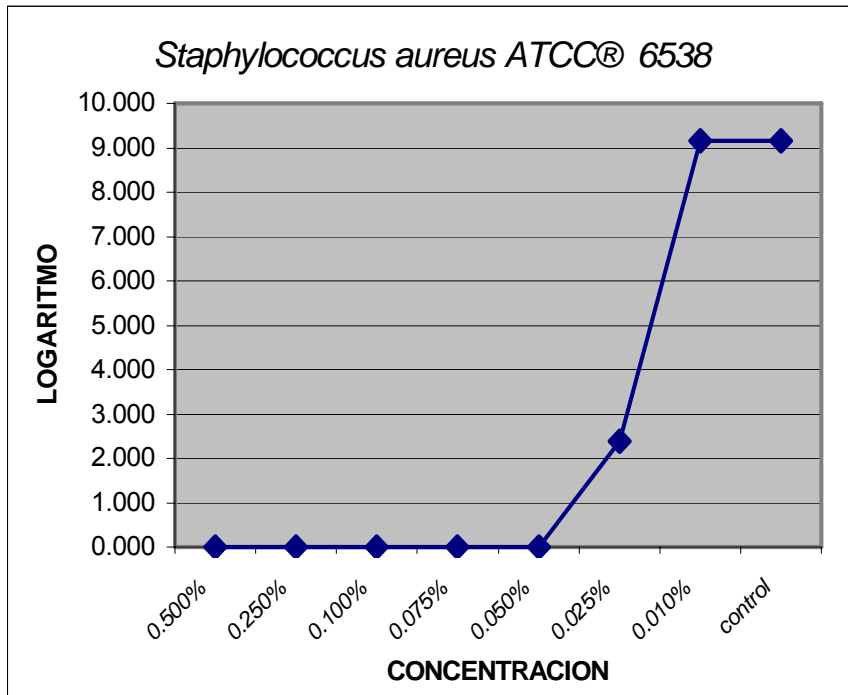


Grafico 13.- Curva del desarrollo del *Staphylococcus aureus* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

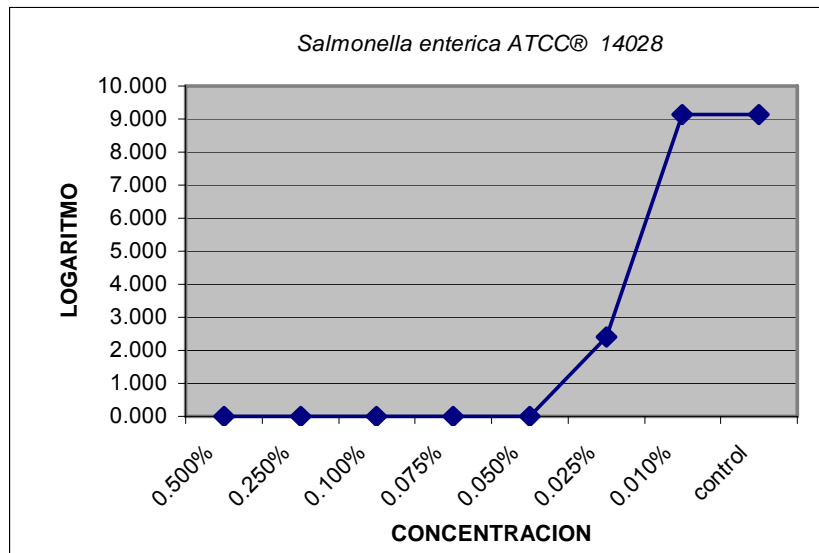


Grafico 14.- Curva del desarrollo de *Salmonella enterica* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

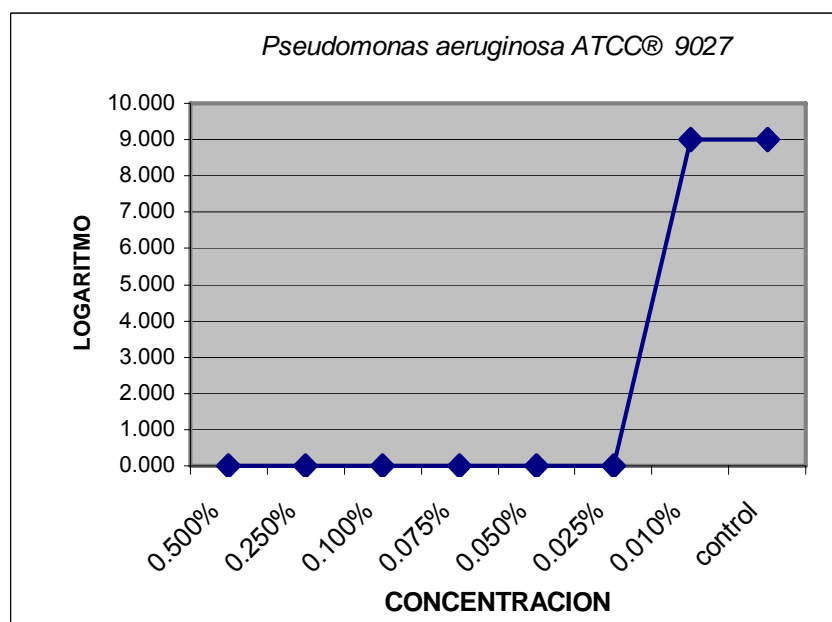


Grafico 15.- Curva del desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

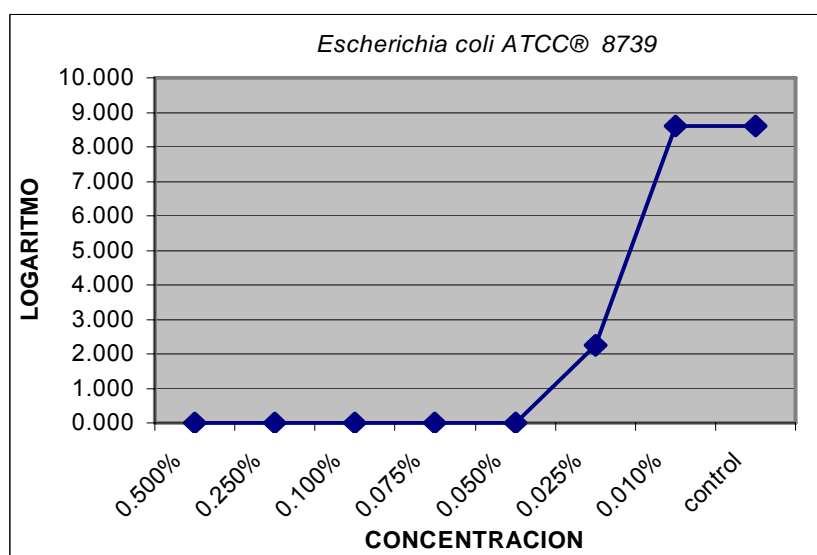


Grafico 16.- Curva del desarrollo de *Escherichia coli* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

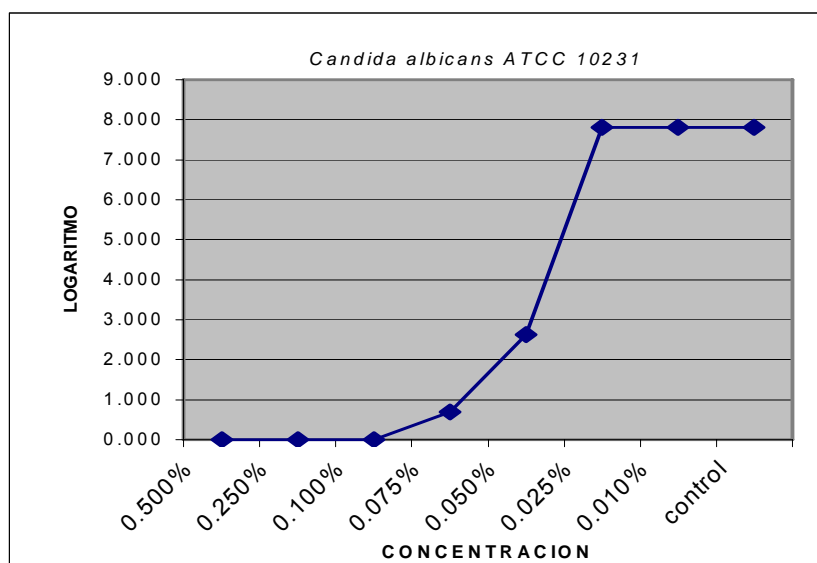


Grafico 17.-Curva del desarrollo de *Candida albicans* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

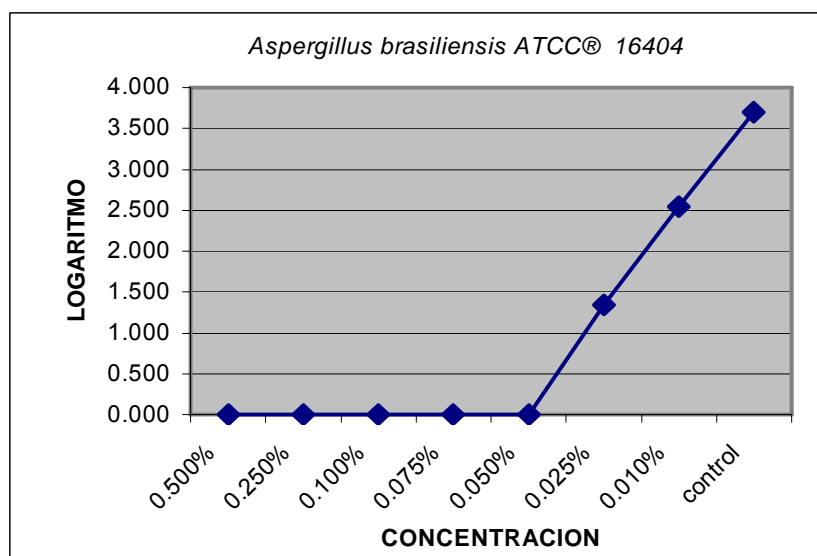


Grafico 18.- Curva del desarrollo de *Aspergillus brasiliensis* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum albidum* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal

Cuadro N°28.- Efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum oblongifolium* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 30 min de enfrentamiento. Resultados expresados en ufc/mL

	Concentración de glicoalcaloides de <i>S oblongifolium</i> Dunal							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ® 6538	0	0	96	925	17×10^8	17×10^8	17×10^8	17×10^8
<i>Salmonella entérica</i> ATCC ® 14028	0	0	0	7	526	36×10^{10}	36×10^{10}	36×10^{10}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC ® 9027	0	0	0	0	0	0	345	40×10^7
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 8739	0	10	660	931	87×10^8	87×10^8	87×10^8	87×10^8
<i>Candida albicans</i> ATCC ®10231	0	0	46	741	65×10^6	65×10^6	65×10^6	65×10^6
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC ® 16404	0	0	32	100	7000	7000	7000	7000

Con la finalidad de graficar la curva de inhibición del crecimiento para cada microorganismo, se optó por obtener el logaritmo a los resultados del Cuadro N°28.

Cuadro N°29.- logaritmo del efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum oblongifolium* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 30 min de enfrentamiento, obtenidos del Cuadro N°28

	Concentración de glicoalcaloides de <i>S. oblongifolium</i> Dunal							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ® 6538	0.000	0.000	1.982	2.966	9.250	9.250	9.250	9.250
<i>Salmonella enterica</i> ATCC ® 14028	0.000	0.000	0.000	0.845	2.721	10.486	10.486	10.486
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC ® 9027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.538	8.602
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 8739	0.000	0.000	2.820	2.969	8.602	8.602	9.940	9.940
<i>Candida albicans</i> ATCC ®10231	0.000	0.000	1.663	2.870	7.813	7.813	7.872	7.872
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC ® 16404	0.000	0.000	1.505	2.000	3.845	3.845	3.845	3.845

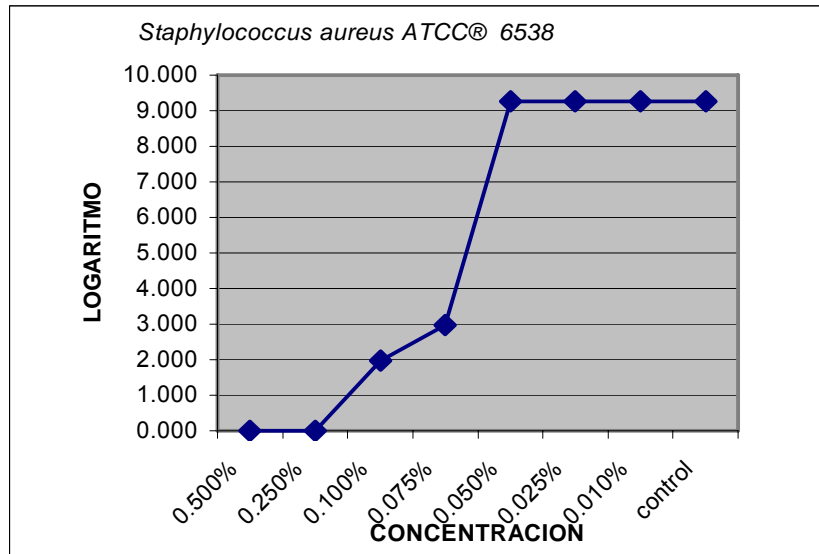


Grafico 19.- Curva del desarrollo de *Staphylococcus aureus* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

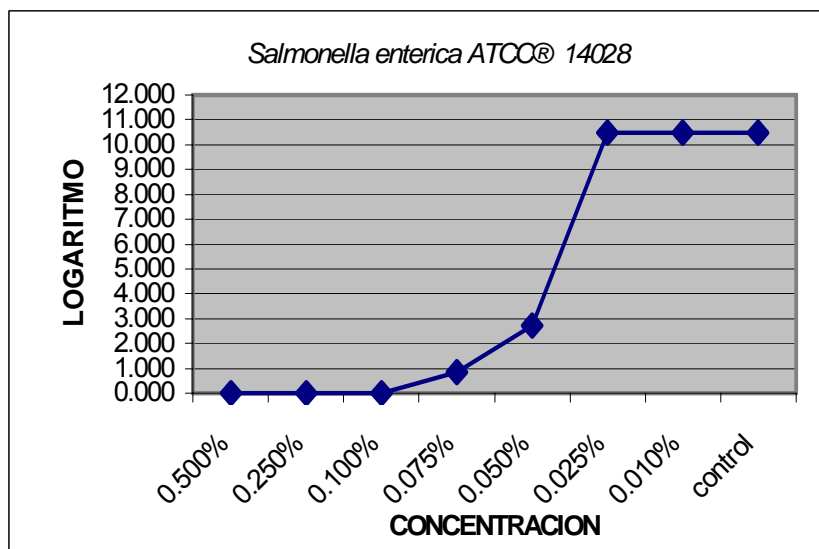


Grafico 20.- Curva del desarrollo de *Salmonella enterica* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

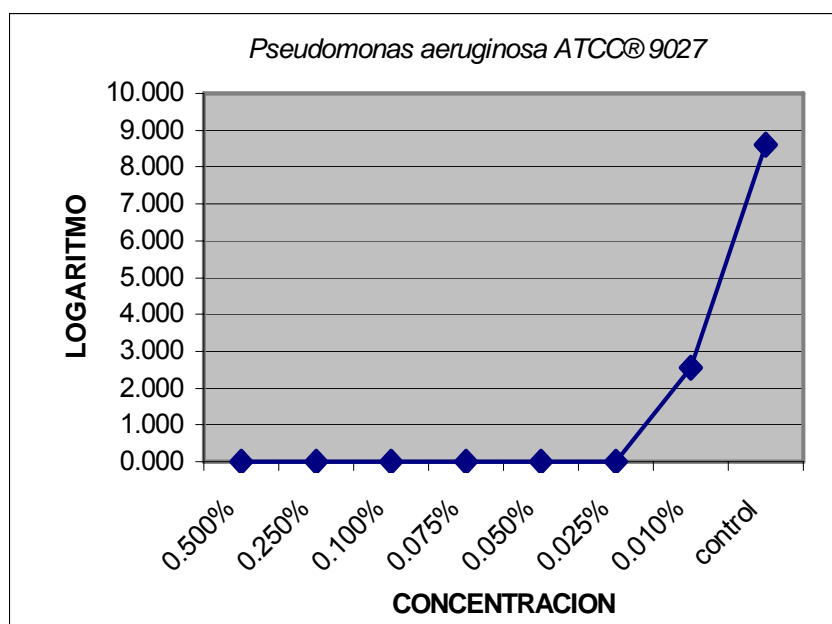


Grafico 21.- Curva del desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

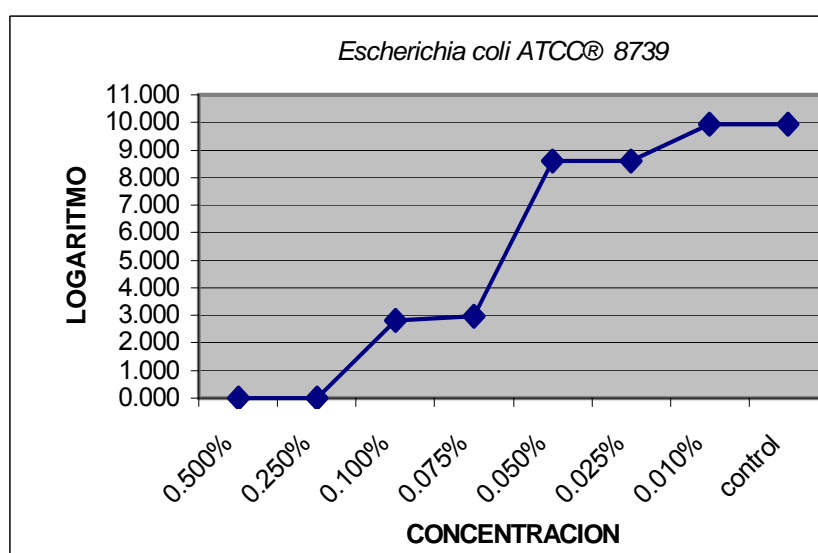


Grafico 22.- Curva del desarrollo de *Escherichia coli* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

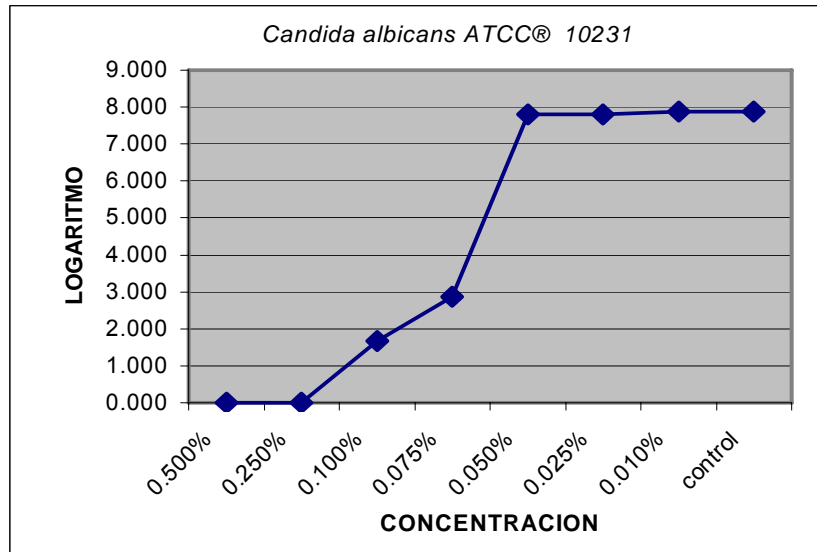


Grafico 23.- Curva del desarrollo de *Candida albicans* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

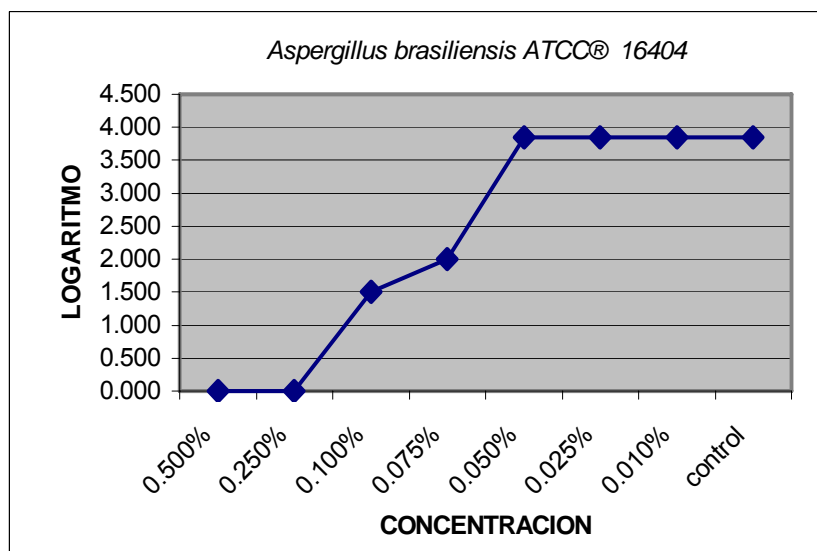


Grafico 24.- Curva del desarrollo de *Aspergillus brasiliensis* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 30 min.

Cuadro N°30.- Efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum oblongifolium* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 24 horas de enfrentamiento. Resultados expresados en ufc/mL

	Concentración de glicoalcaloides de <i>S oblongifolium</i> Dunal							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ® 6538	0	0	0	0	0	230	17 x 10 ⁸	17 x 10 ⁸
<i>Salmonella enterica</i> ATCC ® 14028	0	0	0	0	7	249	36 x 10 ¹⁰	36 x 10 ¹⁰
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC ® 9027	0	0	0	0	0	0	345	40 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 8739	0	0	0	0	5	172	87 x 10 ⁸	87 x 10 ⁸
<i>Candida albicans</i> ATCC ®10231	0	0	0	22	503	65 x 10 ⁶	65 x 10 ⁶	65 x 10 ⁶
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC ® 16404	0	0	0	0	0	22	7000	7000

Con la finalidad de graficar la curva de inhibición del crecimiento para cada microorganismo, se optó por obtener el logaritmo a los resultados del Cuadro N°30

Cuadro N°31.- Logaritmo de los resultados del efecto de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum oblongifolium* Dunal sobre el crecimiento de los microorganismos después de 24 horas de enfrentamiento, obtenido en el Cuadro N°30

	Concentración de los glicoalcaloides de <i>S Oblongifolium</i> Dunal							control
	0.500%	0.250%	0.100%	0.075%	0.050%	0.025%	0.010%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ® 6538	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.362	9.250	9.250
<i>Salmonella enterica</i> ATCC ® 14028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.845	2.396	10.486	10.486
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC ® 9027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.538	8.602
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 8739	0.000	0.000	0.000	0.000	0.699	2.236	9.940	9.940
<i>Candida albicans</i> ATCC ®10231	0.000	0.000	0.000	1.342	2.702	7.813	7.872	7.872
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC ® 16404	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.342	3.845	3.845

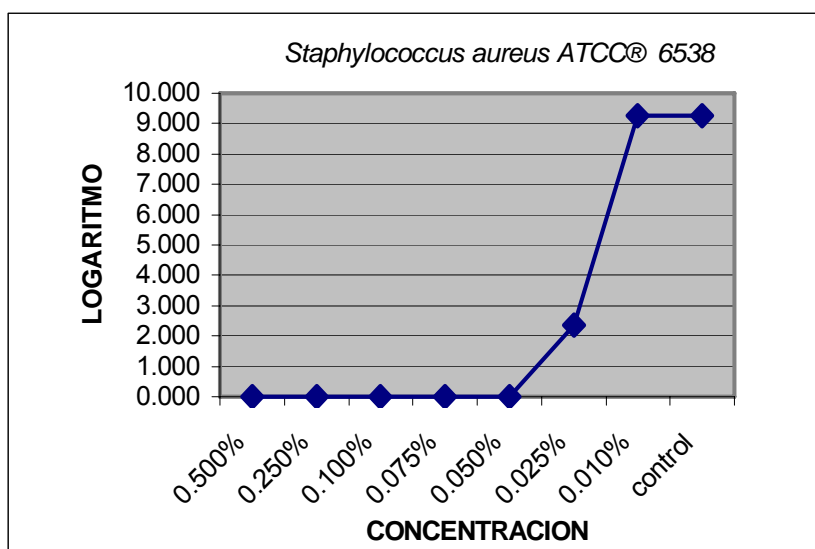


Grafico 25.- Curva del desarrollo de *Staphylococcus aureus* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

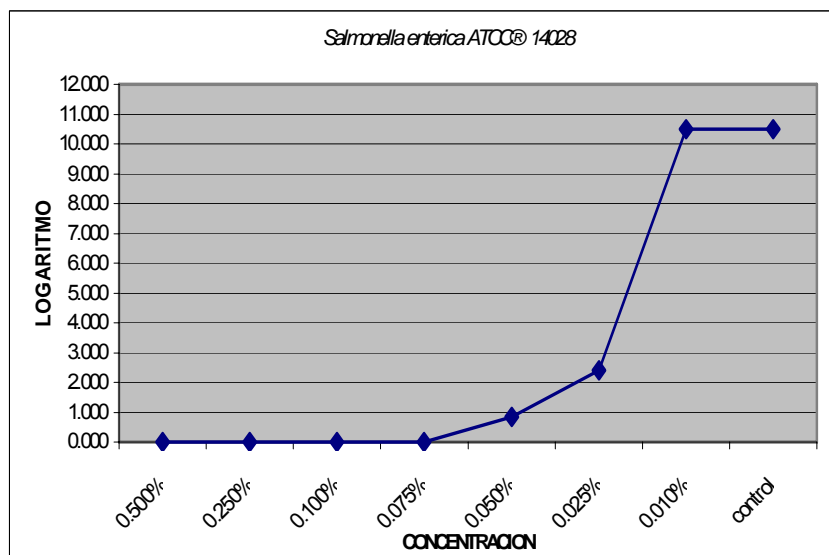


Grafico 26.- Curva del desarrollo de *Salmonella enterica* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

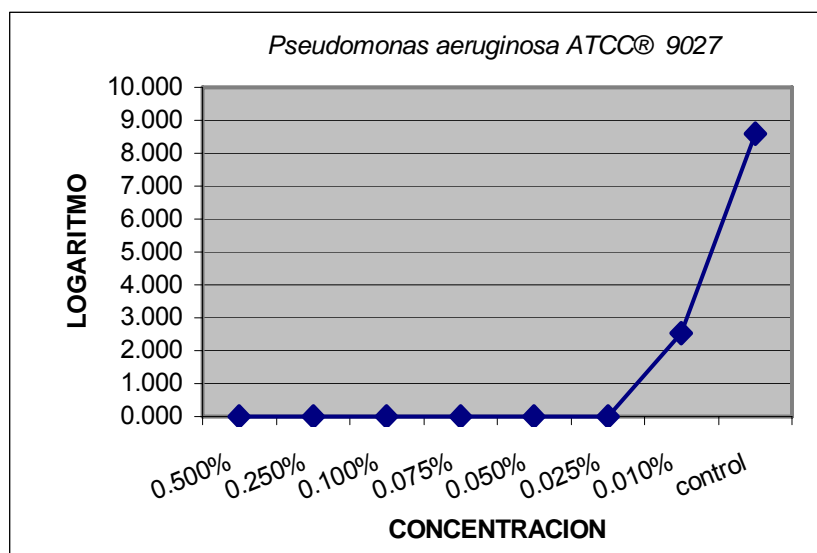


Grafico 27.- Curva del desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

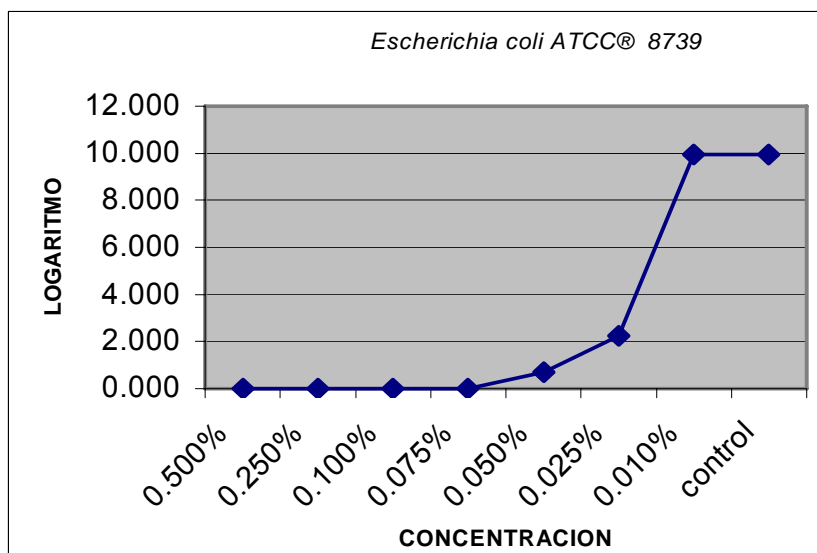


Gráfico 28.- Curva del desarrollo de *Escherichia coli* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

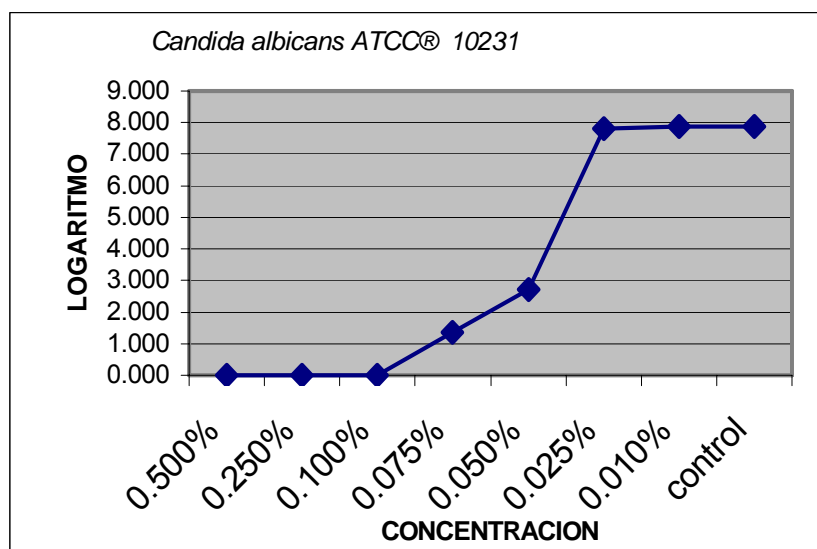


Grafico 29.- Curva del desarrollo de *Candida albicans* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

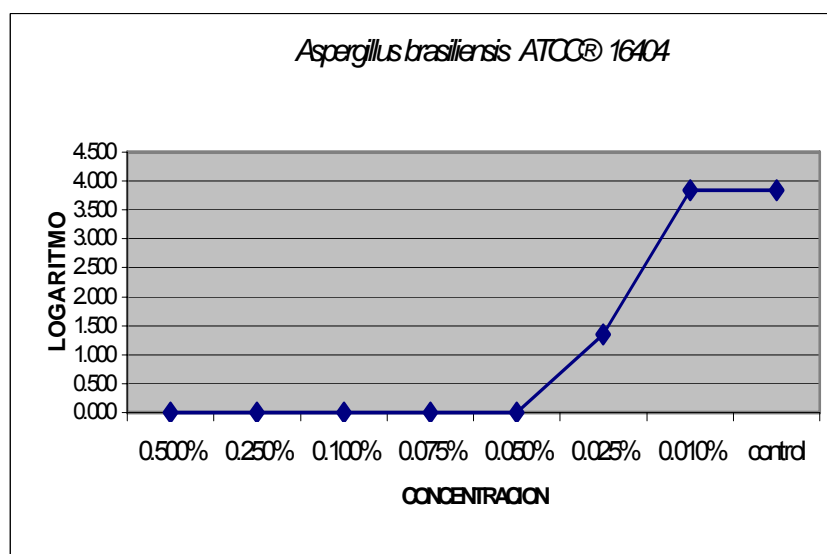


Grafico 30.- Curva del desarrollo de *Aspergillus brasiliensis* frente a la acción de los glicoalcaloides de *Solanum oblongifolium* Dunal por un tiempo de enfrentamiento de 24 horas.

V.- DISCUSIÓN

- 1.- Se colectó en el departamento de Cajamarca dos especies vegetales: *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal, sobre la base de la quimiotaxonomía, es decir de la relación que existe entre la clasificación botánica y la composición química de sus metabolitos, ya que según la bibliografía ^(17, 18) la familia botánica de Solanaceae se caracterizan por presentar metabolitos secundarios llamados Glicoalcaloides.
- 2.- Las hojas de estas dos especies vegetales fueron sometidas a secado y a molienda para luego extraer los glicoalcaloides con el sistema de solventes Etanol: Agua: Ac Ácido acético (90: 8: 2) por maceración con el cual según bibliografía ⁽¹⁵⁾ se obtiene mejores resultados en el aislamiento de glicoalcaloides. En la cromatografía de capa fina se observó una mancha anaranjada para ambas especies indicando la presencia de glicoalcaloides ⁽⁶⁾
- 3.- Se obtuvo mejores resultados al extraer la clorofila de las hojas por un sistema implementado de Soxhlet con n-hexano como solvente, ya que la coloración verdosa impedía observar la coloración anaranjada con el reactivo de Dragendorff en la cromatografía de capa fina.
- 4.- Los espectros infrarrojos de *Solanum oblongifolium* Dunal (1 y 3) y de *Solanum albidum* Dunal (2 y 4) presentan una banda ancha a 3300 cm^{-1} correspondiente a la fracción del carbohidrato. En la región de 900 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} se observa cuatro picos característicos del grupo espiroacetal a longitudes de 980, 920, 900 y 860 cm^{-1} aproximadamente; según se menciona en la bibliografía ⁽³²⁾ éstas absorciones son características de los glicoalcaloides esteroidales y no se presentan en sapogeninas triterpenoides.
- 5.- El contenido de glicoalcaloides en una planta oscila entre 1 y 35 mg por 100g en el material vegetal fresco ^(10, 19); acumulándose en las áreas de mayor actividad metabólica ⁽²⁰⁾ pero estas concentraciones pueden verse afectadas por mecanismos de defensa propios de la planta ⁽²¹⁾, factores genéticos ⁽²²⁾, el medio ambiente ⁽¹⁹⁾, por exposición a la luz del sol o artificial ⁽²³⁾, y por lesiones ⁽⁹⁾. Se consideró la equivalencia encontrada por Sanabria ⁽²⁾ donde 1 ml de Azul de bromofenol 0,067% equivale a 1,05 mg de tomatina, se utilizó el equipo titulador potenciométrico para encontrar el punto de equivalencia, con todo esto se encontró que los glicoalcaloides totales en el extracto desecado de hojas de *Solanum albidum* Dunal se encuentran en 1459,4 mg% calculados como tomatina y en las hojas desecadas se encuentra en 15,786 mg%. El contenido de glicoalcaloides totales en el extracto desecado de hojas de *Solanum oblongifolium* Dunal se encuentra en 1459,3 mg% de glicoalcaloides calculados como tomatina, y en las hojas desecadas se encuentra en 15,286 mg%.

- 6.- Con respecto a la evaluación citotóxica se observó en el estereoscopio las diferentes fases del desarrollo embrionario del erizo de mar: primeros clivajes, mórula, blástula, gástrula y pluteus, notándose que los resultados fueron significativos a las concentraciones de 0.055 mg/mL y 0.110 mg/ml, frente al blanco y control, se observaron daños teratogénicos, mutagenicidad, retardo en el desarrollo embrionario y citotoxicidad, no alcanzando a las 72 horas el estadio de desarrollo pluteus por lo cual se afirma que los extractos de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal a las concentraciones ensayadas presentan actividad citotóxica y citostática, realizándose de acuerdo a la técnica de Gustafson 1971 y Estus 1989, que fue utilizado como un método indirecto para evaluar mutagenicidad y teratogenicidad en el desarrollo embrionario de erizo de mar desde el momento de la fecundación hasta la aparición de la larva pluteus, por considerar que si hay un cambio en el proceso de diferenciación y desarrollo del embrión de erizo de mar y si las condiciones ambientales son las mismas, lo único que diferencia al grupo tratado del grupo control es el extracto de la planta, por tanto, el extracto de la planta estaría afectando el material genético de este animal causando problemas a través de la morfogénesis del mismo.
- 7.- Los resultados obtenidos de la evaluación citotóxica concuerda con lo indicado por otras investigaciones como Chaube⁽⁸⁾ quien indica que los glicoalcaloides alpha-solanina y alpha chaconina producen una elevada letalidad en embriones de rata y efectivamente dan lugar a malformaciones especialmente a nivel esquelético en diferentes especies. Vollmer⁽¹¹⁾ menciona que los glicoalcaloides de *Solanum melongena* L tienen importante actividad toxicológica y citotóxica.
- 8.- Para evaluar si los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal ejercen una acción antibacteriana sobre los microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* se empleó la técnica recuento en placa implementado por el laboratorio farmacéutico IQFarma S.A., que consiste en enfrentar la muestra con la cepa de los microorganismos por un tiempo determinado; en el cual se observa a diferentes concentraciones inhibición en el crecimiento, según el cual quedó demostrada la existencia de un efecto de inhibición del desarrollo microbiano del metabolito estudiado en cada especie.
- 9.- Los resultados indican que existe un efecto antimicrobiano de los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal, lo cual concuerda con otras investigaciones realizadas como la de Fewell⁽⁴⁴⁾ el cual indica que los glicoalcaloides como la solamargina y la solasonina presentan actividad antifúngica, J Kuc⁽²⁾ menciona a los glicoalcaloides como metabolitos de estrés que son importantes en el control de enfermedades por hongos y Gallo⁽⁴³⁾ menciona a los glicoalcaloides como metabolitos con propiedades antibacterianas contra diversos microorganismos gram positivos y gram negativos.

VI CONCLUSIONES

1. Las hojas de *Solanum albidum* Dunal y de *Solanum oblongifolium* Dunal, presentan metabolitos secundarios llamados glicoalcaloides.
2. Los glicoalcaloides se encuentran en 15,786mg% de hojas desecadas de *Solanum albidum* Dunal y en 15,286mg% de hojas desecadas de *Solanum oblongifolium* Dunal calculados como tomatina.
3. Los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal, presentan actividad citotóxica y citostática a la concentración de 0.055 mg/mL y 0.11 mg/mL.
4. Los glicoalcaloides de las hojas de *Solanum albidum* Dunal y *Solanum oblongifolium* Dunal, presentan actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, luego de 30 minutos y de 24 horas de enfrentamiento.

VII RECOMENDACIONES

- 1.- Profundizar en el estudio de los glicoalcaloides esferoidales, con respecto a la parte toxicológica.
- 2.- Profundizar en el estudio clínico para evaluar la actividad antibacteriana contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*; la cual, según los resultados obtenidos, presenta mayor actividad.
- 3.- Los glicoalcaloides son metabolitos que se encuentran en todas las partes de la planta del género *Solanum*, por lo que se recomienda a la población el cuidado respectivo en el consumo, en especial en mujeres embarazadas.

VIII.-BIBLIOGRAFIA

1. Schreiber K., Steroids alkaloids of the Solanum group. en The Alkaloids, Ed por R.H.F. Manske Academic Press, New York, 1968; 10: 1-192.
2. Kuc J., Henflign J., Garas N. y Doke Y., Food J. Protection 1979; 42: 508-511.
3. Tinyen W.M., Am Potato. 1984; 61: 157-167.
4. Nishie k., Gumbmann M.R. y Keyl A.C., Toxicology and Applied Pharmacology, 1971; 19: 81-92.
5. Sadhay S.J. y Salhunke Y., Advances Food Research, 1975; 21: 307-354.
6. Nevin N. y Merret D., Br. J. Prev. Soc. Med., 1975; 229: 111-115.
7. Renwich J.H. , Br J. Prev. Soc. Med., 1972; 26: 67-68.
8. Chaube S. y Swinyrad C., Toxicology and Applied Pharmacology, 1976; 36: 227-237.
9. Ftizpatrick T.J., Mackenzie J.D. y Gregory P., Am. Potato, 1978; 55: 247-248.
10. Bushway R.J., Wilson A.M. y Bushway A.A., Am Potato, 1980; 57: 561-565.
11. Vollmer G. Josst G. Schenker D, Sturm W. Vreden N. Elementos de bromatologia descriptive, Zaragoza: Acribia, 1999.
12. Midio AF. Martins DI. Toxicologia de alimentos. Sao Paulo: Varela, 2000.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobials. 1999; 26.
14. Isenberg DH. Tests To Assess Bactericidal Activity. Antimicrobial Susceptibility Testing Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington 1999; 5(16): 1-14.
15. Esteves A; Sarmiento T; Fernández C, Carvalho M; Braz R, Echevarria A. Cytotoxic Activities Against Ehrlich Carcinoma and Human K562 Leukaemia of Alkaloids and Flavonoid from Two Solanum Species. J. Braz. Chem. Soc., 2002; 13(6): 838-842.

16. Sanabria A; Heredia P; Velasquez M; Moreno J. Glicoalcaloides como criterio de selección en clones de papa colombiana. Rev. colombiana de ciencias químico-farmacéuticas. 1991; 19: 63-69.
17. De Andrade M, Berinjela: Que antecedente familiar Terrible. Arq Bras Endocrinol Metab 2004; 48: 572-574.
18. Schreiber K. Steroid alkaloids of the Solanum group en the alkaloids. Ed R.H.R. Manske Academic Press, New York, 1968, 10: 1-192.
19. Sinden S.L. y Webb R.E., Am Potato. 1942; 49: 334-338.
20. Reeve R., Huataza E. y Wayer M.. Am Potato. 1979; 46: 374-386.
21. Jadhav S, LTUZ. S, MAZZA G. Potato glycoalkaloids: Chemical, analytical, and Biochemical perspectives. ACS Symposium Series. 1997; 662: 94-114.
22. Coxon D.T., Price K.R. y Jones P.G.. J. Sci. Food Agric., 1979; 30: 1043-1049.
23. Patil B.C., Salunkhe D.K. y Songh B.. J. Food Sci, 1971; 36: 474-476.
24. Hunziker, A.T.: South American Solanaceae: a synoptic review. D'ARCY, W.G.: The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Linn. Soc. Symp. Linnean Soc. & Academic Press; London. 1979;7: 48-85 .
25. Balken, J.A. THE PLANT FAMILY SOLANACEAE: FRUITS IN SOLANACEAE; <http://www.hvanbalken.com/fruit.html>
26. Chiesa FA, Moyna P. Alcaloides esteroidales. Ln: Simoes CMO, Shenkel EP, Gosmann G, Meillo JCP, Mentz LA, Petrovick PR, Eds. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 2003; 5: 869-83.
27. Ellenhorn MJ. Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning. Baltimore Williams & Wilkins, 1997.
28. Rosenfeld HJ, Sumdell PL, Ringstad M. Influence of packaging materials and temperature on the glycoalkaloid content of potato tubers, Food Res Int 1995; 28:481-4.
29. Conn EE, Stumpf PK. Introducao à bioquímica. Sao Paulo; Edgard Blucher, 1980.
30. Tortora GJ, Funke BR, Case CL, Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2000.

31. Salatino A. A Composicao Molecular das células vegetais. Ln: Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE, Eds. Biologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 6: 16-39.
32. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Peru. Primera edición, 1988
33. Blankemeyer JT, Stringer BK, Rayburn JR, Bantle JA, Friedman M. Effect of potato alkaloids on membrane potential of frog embryos. J Agric Food Chem. 1992;40:2022-2026.
34. Blankemeyer JT, Atherton R, Friedman M. Effect of potato Glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine on sodium active transport in frog skin. J Agric Food Chem. 1995;43:636-639.
35. Blankemeyer JT, McWilliams ML, Rayburn JR, Weissenberg M, Friedman M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. Food Chem Toxicol. 1998;36:383-389.
36. Roddick JG, Rijnenberg AI, Osman SF. Synergistic interaction between potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to destabilization of cell membranes ecological implications. J Chem Ecol. 1988;14:889-902.
37. Keukens EA, De Vrije T, Van Den Boom C, De Waard P, Plasman HH, Thiel F, et al. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. Biochim Biophys Acta. 1995; 1240:216-228.
38. Nishie, K., T. J. Fitzpatrick, A. P. Swain, and A. C. Keyl. Positive inotropic action of Solanaceae glycoalkaloids. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1976; 15(3):601-607.
39. Brown, D. and R. F. Keeler. Structure-activity relation of steroid teratogens. Solanidan epimers. J. Agric. Food Chem. 1978; 26(3):566-569.
40. Gaffield, W. and R. F. Keeler. Implication of C-5, C-6 unsaturation as a key structural factor in steroidal alkaloid-induced mammalian teratogenesis. Experientia. 1993; 49(10):922-924.
41. Rayburn, J. R., J. A. Bantle, and M. Friedman.. Role of carbohydrate side chains of potato glycoalkaloids in developmental toxicity. J. Agric. Food Chem. 1994; 42:1511-1515.
42. Keukens, E. A. J., T. de Vrije, C. van den Boom, P. de Waard, H. H. Plasman, F. Thiel, V. Chupin, W. M. F. Jongen, and B. de Kruijff.. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. Biochim. Biophys. Acta. 1995; 1240:216-228.

43. Gallo P. Valeri H. The antibiotic activity of some extracts of *Solanum mammosum*, *Cassia occidentalis*, and *Cecropia* species. *Rev. Med. Vet. Y parasitol.* 1953(12): 119-124.
44. Fewell AM., Roddick JG, Weissenberg M. Interactions between the glycoalkaloids Solanine and Solamargine in relation to inhibition of fungal growth. *Phytochemistry.* 1994(37): 1007-1011.

IX.- ANEXOS

Certificado de calibración para titulador potenciometrico Mettler Toledo

DL 53

Nº Certificado

EX - 1313 - 2008

Compañía Medufarma

Av. Santa Rosa 390 - Ate

SAP

Equipo certificado

Modelo de Titulador

DL 53

S/N

5122460697

Ident. Interna Nº

Version de software

Equipo Patron

Voltimetro digital certificado

Marca

Fluke

Modelo

87V

Ultimo certificado

22 de noviembre del 2007

S/N

74300348

Nº de certificado

07 - 620

Resistencias certificadas

Marca

METTLER TOLEDO

Modelo

Kit de calibracion ME-51302410

Ultimo certificado

22 de Junio del 2004

S/N

A047

Nº de certificado

3620

La calibración y certificación del titulador descrito líneas arriba ha sido de acuerdo a las recomendaciones del fabricante Mettler Toledo, según instrucciones ME-51710654. Los resultados de medición indicados en las páginas siguientes han sido obtenidos bajo condiciones ambientales de 10°C a 30°C y humedad relativa de 40% a 90%.

1. Calibración del Sensor de entrada .

Entrada de una fuente externa mV	Entrada del Sensor antes del ajuste mV	Entrada del Sensor después del ajuste mV	Max. error permisible (tolerancia) de la entrada del sensor +/- mV	Error dentro de las tolerancias del instrumento después del ajuste Si/No
0.0	0.0	0.0	0.1	Conforme
180.0	180.1	180.0	0.1	Conforme
500.0	500.0	500.0	0.1	Conforme
1000.0	1000.1	1000.0	0.1	Conforme
1900.0	1900.2	1900.0	0.1	Conforme
-1900.0	-1900.1	-1900.0	0.1	Conforme
-1000.0	-1000.1	-1000.0	0.1	Conforme
-500.0	-500.0	-500.0	0.1	Conforme
-180.0	-180.0	-180.0	0.1	Conforme

Calibración y/o Verificación de electrodos

Electrodo	mV (7.00)	mV (4.01)	mV (9.21)	AgNO3 0.1N	Sol. 220mV	Agua	Status
DG111-SC	6.5	181.3	-140.5	N/A	N/A	N/A	Conforme
DG113-SC	-9.4	161.7	-1301.2	N/A	N/A	N/A	Conforme
DG115-SC	2.6	176.2	-135.2	N/A	N/A	N/A	Conforme
DM140-SC	N/A	N/A	N/A	N/A	223.8	N/A	Conforme
DM141-SC	N/A	N/A	N/A	305.1	N/A	N/A	Conforme
DP5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Conforme

N/A: No aplica

Nota: Los procedimientos de calibración y/o verificación son detallados por el fabricante en los manuales de los electrodos.

3 Aceptación del Certificado

El titulador potenciométrico METTLER TOLEDO mencionado arriba ha sido calibrado. Los valores obtenidos de mV están dentro de los límites de error permisible del equipo.

Conforme ☒ X

No Conforme ☐

Observaciones

El equipo se encuentra operativo

Se recomienda mantenimiento preventivo cada 3 meses.

Se recomienda dejar los electrodos en su solución de relleno sobre el nivel mínimo, rellenar los

electrodos dentro de su tolerancia y cambia la solución de almacenamiento regularmente.

Lugar: Instalaciones del Cliente


Fecha: 27 de Mayo del 2008

Ing. de servicio: Jesús Tenorio Sernaqué

Firma

Revisado por: Bruno Palacios Vasquez

Firma


	CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN DE RENDIMIENTO SPECTRUM 100	CÓDIGO :
		FGPV_CVR_IRS100
		REVISIÓN : 01
		APROBADO : GOC
		ELABORADO: ST
		FECHA : 08/05/07

ESPECTROFOTÓMETRO INFRARROJO

PERKIN ELMER SPECTRUM 100


SN: 81270

Compañía:	LABORATORIOS TRIFARMA S.A.
Dirección:	Av. Santa Rosa 390 Urb. Aurora – Ate Vitarte
Área:	Control de Calidad
Responsable:	Julisa Ortiz
Teléfono:	326-1046
Fecha de Evaluación:	Octubre 13, 2008
Próxima Certificación:	
Periodo recomendado:	6 meses
Fecha Sugerida:	Abril, 2009
No. de Certificado:	LM00195C
Fecha Ultimo Certificado:	-----
Teléfono de Consultas:	444-9993


	CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN DE RENDIMIENTO SPECTRUM 100 FT-IR	CÓDIGO :
		FGPV_CVR_IRS100FT-IR
		REVISIÓN : 01
		APROBADO : GOC
		ELABORADO: ST
		FECHA : 08/05/07

Revisión C

CONFIGURACIÓN EVALUADA:		ACCESORIOS / COMPONENTES, NO INCLUIDOS	
Modelo	No. Serie	Modelo	No. Serie
SPECTRUM 100	81270		
Equipo de Prueba	Número de Serie		
-----	-----		
Estándares Utilizados	Número de Lote	Fecha de Expiración	
Polystyrene TRM	PE06465	Mayo 2011	
Suministrado por Cliente	Observaciones	Iniciales de Cliente	
-----	-----	-----	

	CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN DE RENDIMIENTO SPECTRUM 100 FT-IR	CÓDIGO : _____
		FGPV_CVR_IRS100FT-IR
		REVISIÓN : 01
		APROBADO : GOC
		ELABORADO: ST
		FECHA : 08/05/07

No. de Serie: <u>81270</u>		FECHA DE EVALUACIÓN: <u>Octubre 13, 2008</u>
PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Amplitud de Láser	0.3 a 0.95 V	<u>0.57 V</u>
Amplitud de Igram		
Max. Amplitud de Igram	0.6 a 0.95 V	<u>0.79 V</u>
Calibración de Longitud de Onda	Error de Calibración < 0.1 cm ⁻¹	<u>-0.005 cm⁻¹</u>
Hay más de un error de calibración.		
Registrar el último.		
Prueba de Background		
%Corte de Energía (norm)	Promedio 160 – 100 cm ⁻¹ < 0.2%	<u>0.0151 %</u>
Prueba Señal a Ruido	Detector TGS > 6000 : 1	<u>10000:1</u>
Razón Señal a Ruido Típica SNR		
Prueba de Polystyrene	3082.18 ± 0.5 cm ⁻¹	<u>3082.04 cm⁻¹</u>
Registrar los picos en las longitudes	3060.02 ± 0.5 cm ⁻¹	<u>3060.02 cm⁻¹</u>
de onda especificadas.	1601.34 ± 0.5 cm ⁻¹	<u>1601.30 cm⁻¹</u>
	1583.12 ± 0.5 cm ⁻¹	<u>1583.13 cm⁻¹</u>
	1028.34 ± 0.5 cm ⁻¹	<u>1028.52 cm⁻¹</u>

	CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN DE RENDIMIENTO SPECTRUM 100 FT-IR	CÓDIGO : FGPV_CVR_IRS100FT-IR REVISIÓN : 01 APROBADO : GOC ELABORADO: ST FECHA : 08/05/07
---	--	--


OBSERVACIONES:

Este documento CERTIFICA que las pruebas realizadas y la configuración evaluada
☒ cumple
☐ no cumple
las especificaciones de PERKIN ELMER, indicadas en este Certificado.

Este documento no modifica los términos estándar y las condiciones de venta de PERKIN ELMER, incluyendo los términos de garantía. PERKIN ELMER no asume compromiso por los resultados de las pruebas,

Cientifica Andina S.A.C

Representante Autorizado P-E:


Dpto. de Servicio

MicroBioLogics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release

Specifications

Microorganism Name: *Aspergillus brasiliensis*
Catalog Number: 0392
Lot Number: 39281
Reference Number: ATCC® 16404™**
Purity: Pure
Recovery: > 1000 CFUs per Pellet
Passage from Reference: 2
Expiration Date: 2010/05

Additional Information**Release Information:**

Quality Control Technologist: Carol Stanoch
Release Date: 2008-06-16
Disclaimer:
Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packi
slip is merely a packaging event number. The actual L
Number is the first 5 digits of the printed lot number

Performance**Macroscopic Features:**

Rapidly growing colonies which are initially white or pale yellow, quickly become black with conidia (spore) production. Reverse is pale yellow.

Medium:

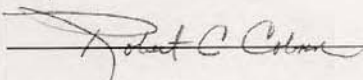
Nutrient

Microscopic Features:

Chains of small conidia which arise from short sterigmata arranged radially over the surface of the vesicle

Method:

Lactophenol Blue

Vitek**Phenotypic Features****Results****Other Features/Challenges: Results**

AUTHORIZED SIGNATURE

Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.



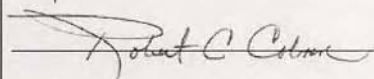
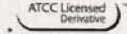
The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2008 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved.
217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml

MicroBioLogics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release

Specifications		Additional Information
Microorganism Name: Candida albicans Catalog Number: 0443 Lot Number: 44336 Reference Number: ATCC® 10231™** Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2 Expiration Date: 2010/02		Release Information: Quality Control Technologist: Nicole Ruprecht Release Date: 2008-04-14 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the pack/slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number.
Performance Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies Microscopic Features: Gram positive, spherical, budding yeast cells		Medium: Nutrient Method: Gram Stain
Vitek YBC Phenotypic Features		Other Features/Challenges: Results Germ Tube Test: positive Cornmeal Agar: chlamydospore production
	Results Galactose + Lactose - Sucrose + Maltose + Cellobiose - α-Methyl-D-Glucoside + Xylose + Arabinose - Trehalose + Melezitose - Raffinose - N-Acetyl-D-Glucosamine + Xylitol + Dulcitol - Adonitol + Palatinose + Glycerol + Sorbitol + Erythritol - Melibiose - Cyclohexamide + Glucose + Inositol - Nitrate - 2-Keto-D-Gluconate + Urea -	 AUTHORIZED SIGNATURE
Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>  <p>The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p>© 2008 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303</p> </div> <div> <p>DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml</p> </div> </div>		

MicroBioLogics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release

Specifications

Microorganism Name: Escherichia coli
 Catalog Number: 0483
 Lot Number: 48312
 Reference Number: ATCC® 8739™*
 Purity: Pure
 Recovery: > 1000 CFUs per Pellet
 Passage from Reference: 2
 Expiration Date: 2010/05

Additional Information

Release Information:
 Quality Control Technologist: Carol Stanoch
 Release Date: 2008-07-16
 Disclaimer:
 Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packi
 slip is merely a packaging event number. The actual L
 Number is the first 5 digits of the printed lot number

Performance

Macroscopic Features:
 Medium to large, gray, mucoid, convex

Medium:
 SBAP

Microscopic Features:
 Gram negative straight rod

Method:
 Gram Stain

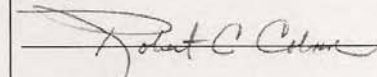
Vitek GNI+

Other Features/Challenges: Results**Phenotypic Features****Results**

Hydroxydiphenylether
 Glucose (Oxidation)
 Growth Control (Tryptophan)
 Acetamide
 Esculin
 Indoxyl-B-D-glucoside
 Urea
 Citrate
 Malonate
 Tryptophan
 Polymyxin B
 Lactose
 Maltose
 Mannitol
 Xylose
 Raffinose
 Sorbitol
 Sucrose
 Inositol
 Adonitol
 p-Coumaric
 Hydrogen Sulfide
 ONPG
 Rhamnose
 Arabinose
 Glucose (Fermentation)
 Arginine
 Lysine
 Ornithine
 Oxidase

-
 +
 +
 -
 -
 -
 -
 -
 -
 -
 -
 +
 +
 +
 +
 -
 +
 -
 -
 -
 +
 +
 +
 +
 -
 +
 -
 -
 -

Oxidase (Kovacs): negative
 MUG(E. coli Broth w/MUG): positive



AUTHORIZED SIGNATURE

Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.



The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2008 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved.
 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml

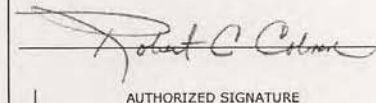
MicroBioLogics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release

Specifications	Additional Information
Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Release Information:
Catalog Number: 0484	Quality Control Technologist: Megan Kasner
Lot Number: 48413	Release Date: 2008-07-14
Reference Number: ATCC® 9027™*	Disclaimer:
Purity: Pure	Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packi
Recovery: > 1000 CFUs per Pellet	slip is merely a packaging event number. The actual L
Passage from Reference: 2	Number is the first 5 digits of the printed lot number
Expiration Date: 2010/04	

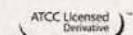
Performance	
Macroscopic Features: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen	Medium: SBAP
Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod	Method: Gram Stain

Vitek GNI+	Other Features/Challenges: Results
Phenotypic Features	Results
Hydroxydiphenylether	+
Glucose (Oxidation)	+
Growth Control (Tryptophan)	+
Acetamide	+
Esculin	-
Indoxyl-B-D-glucoside	-
Urea	-
Citrate	+
Malonate	+
Tryptophan	-
Polymyxin B	-
Lactose	-
Maltose	-
Mannitol	+
Xylose	-
Raffinose	-
Sorbitol	-
Sucrose	-
Inositol	-
Adonitol	-
p-Coumaric	-
Hydrogen Sulfide	-
ONPG	-
Rhamnose	-
Arabinose	-
Glucose (Fermentation)	+
Arginine	+
Lysine	-
Ornithine	-
Oxidase	+
10% Lactose	-

Oxidase(Kovacs): positive
Motility B Medium: positive


AUTHORIZED SIGNATURE

Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.



The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2008 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved.
217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml

14/08/2008

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release

Specifications	Additional Information
<p>Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i></p> <p>Catalog Number: 0485</p> <p>Lot Number: 48528</p> <p>Reference Number: ATCC® 6538™**</p> <p>Purity: Pure</p> <p>Recovery: > 1000 CFUs per Pellet</p> <p>Passage from Reference: 2</p> <p>Expiration Date: 2010/08</p>	<p>Release Information:</p> <p>Quality Control Technologist: Carol Stanoch</p> <p>Release Date: 2008-09-18</p> <p>Disclaimer:</p> <p>Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packaging slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number.</p>

Performance

Macroscopic Features:

Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.

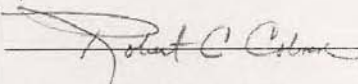
Medium:
SBAP

Method:
Gram Stain

Microscopic Features:

Microscopic Features:
Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters

Vitek	GPI	Other Features/Challenges: Results
Phenotypic Features	Results	Catalase(3% Hydrogen Peroxide): positive
Peptone Base	+	Coagulase(rabbit plasma-tube): positive
Bacitracin	+	Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
Optochin	+	
Hemicellulase	-	
6% NaCl	+	
10% Bile	+	
40% Bile	+	
Esculin	-	
Arginine	-	
Urea	-	
Tetrazolium Red	+	
Novobiocin	-	
Dextrose	+	
Lactose	-	
Mannitol	+	
Raffinose	-	
Salicin	-	
Sorbitol	-	
Sucrose	+	
Trehalose	+	
Arabinose	-	
Pyruvic acid	-	
Pullulan	-	
Inulin	-	
Melibiose	-	
Melezitose	-	
Cellobiose	-	
Ribose	-	
Xylose	-	
Catalase	+	
N/A	+	



AUTHORIZED SIGNATURE

Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.



* The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2008 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved.
217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC.286 REVISION 2008,February.28 dt/ml